



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da**  
**Silva**  
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**BRUNA MARIA DE SÁ PEREIRA**

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS COM O DESENVOLVIMENTO  
DE TUMORES DE WILMS**

**Orientadoras: Dr(a). Beatriz de Camargo**  
**Dr(a). Sheila Coelho Soares Lima**

**RIO DE JANEIRO**  
**2022**

## Ficha catalográfica

P436i Pereira, Bruna Maria de Sá

Investigação de mecanismos envolvidos com o desenvolvimento de Tumor de Wilms. / Bruna Maria de Sá Pereira. – Rio de Janeiro, 2022.

215 f. : il. Color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2022.

Orientadores: Prof. Dr<sup>a</sup>. Beatriz de Camargo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sheila Coelho Soares Lima

1. Tumor de Wilms. 2. Proteínas Ribossômicas. 3. Genes de RNAr. 4. RNA Mensageiro. 5. Metabolômica. 6. Expressão Gênica. I. Camargo, Beatriz de. (Orient.). II. Lima, Sheila Coelho Soares. (Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.042

Catálogo na fonte  
Kátia Simões CRB7/5952



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da**  
**Silva**  
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**Pós-Graduação em Oncologia**

**BRUNA MARIA DE SÁ PEREIRA**

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS COM O DESENVOLVIMENTO  
DE TUMORES DE WILMS**

**Tese de doutorado apresentada ao  
Instituto Nacional de Câncer José  
Alencar Gomes da Silva como  
requisito para a obtenção do título  
de Doutor em Oncologia.**

**Orientadoras: Dr(a). Beatriz de Camargo  
Dr(a). Sheila Coelho Soares Lima**

**RIO DE JANEIRO  
2022**



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da**  
**Silva**  
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**Pós-Graduação em Oncologia**

**BRUNA MARIA DE SÁ PEREIRA**

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS COM O DESENVOLVIMENTO  
DE TUMORES DE WILMS**

**Orientadoras: Dr(a). Beatriz de Camargo**  
**Dr(a). Sheila Coelho Soares Lima**

**EXAMINADORES:**

**Dra. Renata Binato Gomes – INCA/RJ**

**Dr. Elvis Terci Valera – FMRP/USP**

**Dra. Ljubica Tásic – UNICAMP/SP**

**Dr. Murilo Vieira Geraldo – UNICAMP/SP**

**Dr. Fernando Regla Vargas – FIOCRUZ/RJ**

**Dr. Robson de Queiroz Monteiro – UFRJ/RJ**

**RIO DE JANEIRO**  
**2022**

## **Agradecimentos**

Chego ao fim dessa etapa, e, mais uma vez, digo que não poderia deixar de agradecer a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desse trabalho. Como sempre acreditei, nenhum dever é mais importante do que a gratidão. Por isso, deixo aqui, de forma mais sincera o meu agradecimento...

À Deus, sempre e em primeiro lugar. Em meio aos percalços encontrados, nunca ter me deixado desistir; em meio a uma pandemia, ter me dado saúde; e por todas as oportunidades que surgiram em meu caminho nesses anos, ter me permitido vivê-las e sempre aprender e crescer com cada uma delas. Das coisas boas ficam as lembranças, e das “não tão boas”, o aprendizado.

Às crianças com câncer, em especial, às portadoras de tumor de Wilms, pois, sem elas este trabalho jamais seria realizado.

A minha família... meus pais Sônia e José Geraldo, e meu irmão Diego, que mesmo distantes, são o que me sustentam e me dão força e apoio em todos os momentos. Impossível não falar de vocês e não me emocionar... nenhuma palavra que eu diga é suficiente para agradecer a dedicação e abdicção de vocês...

Ao meu esposo Felipe, por estar comigo todos os dias, desde o início dessa jornada, por me incentivar e apoiar quando precisei, por aguentar os dramas e choros, e por vibrar com cada conquista e me fazer acreditar que sou capaz de sempre mais...

Aos amigos, que embora distantes, sempre se fizeram presentes. E aos que, próximos, fizeram os dias mais leves.

Ao longo dessa caminhada, algumas pessoas que cruzaram meu caminho foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui. Cito especialmente duas delas: Dra. Beatriz de Camargo e Dra. Mariana Maschietto. Mais que orientadoras e grandes pesquisadoras, tornaram-se amigas e parceiras na construção de um sonho. Abriam-me portas, acreditaram em mim, me deram oportunidades, me ensinaram tanto profissionalmente quanto pessoalmente através das discussões científicas e das conversas pessoais. Obrigada pela paciência, atenção, carinho e compreensão. Vocês são exemplos para mim de pessoas e profissionais, guardarei sempre com muito carinho.

À Dra. Sheila Coelho, comigo desde o aperfeiçoamento, uma grande profissional, exemplo de entrega, dedicação e amor a ciência. Meus sinceros

agradecimentos! A todo o Programa de Carcinogênese Molecular, em especial aos alunos do grupo de Epigenética de tumores, pelas discussões científicas.

Dr. Paulo Faria...uma referência como profissional, e uma grande pessoa, com sua paciência e carinho sempre disposto a abrir um espaço nos seus dias para compartilhar um pouco do muito que sabe e por ser um grande incentivador deste trabalho. Meu muito obrigada!

Ao INCA, por me permitir mergulhar no universo da oncologia, pela estrutura, pelos profissionais com os quais tive o prazer de trabalhar. Professores, pesquisadores e todos os funcionários.

Ao DIPAT-INCA e ao BNT-INCA, em especial à Priscilla Valverde, Dra. Maria Theresa Accioly e Diego Gomes, por serem sempre solícitos e por todo o suporte necessário para a condução deste trabalho.

À USF, Dra Andreia Porcari e em especial ao Pedro Godoy pelo empenho e toda ajuda nas análises; o trabalho de vocês foi fundamental para a construção deste projeto.

Às agências de fomento: CNPQ, FAPERJ, FAPESP, SWISSBRIDGE e Ministério da Saúde, pelo suporte financeiro.

Enfim... a todos, que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui... meus mais sinceros agradecimentos. Sozinhos, não somos nada e o caminho é mais fácil quando estamos acompanhados.

*“Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer.” (Amyr Klink).*

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xviii
<b>RESUMO</b> .....	xxiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xxiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	25
1.1. TUMOR DE WILMS (TW): ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS.....	25
1.2. ASPECTOS HISTOLÓGICOS E TRATAMENTO.....	27
1.3. BIOLOGIA DOS TWs .....	33
1.3.1. Alterações genéticas em TW.....	33
1.3.2. Alterações epigenéticas em TW.....	36
1.3.2.1. Alterações do padrão de metilação do DNA.....	37
1.3.2.2. Alterações em miRNAs.....	39
1.3.3. Alterações de expressão gênica em TW.....	42
1.3.4. Alterações de expressão proteica em TW.....	43
1.4. DADOS PRÉVIOS – SELEÇÃO DOS ALVOS DO ESTUDO.....	44
1.5. VIA RIBOSSOMAL - ASPECTOS FISIOLÓGICOS, FUNÇÕES EXTRA- RIBOSSOMAIS E MECANISMOS RELACIONADOS À DESREGULAÇÃO DA VIA.....	46
1.6. <i>RPL5</i> E <i>RPL11</i> - PAPÉIS RELACIONADOS À REGULAÇÃO DA VIA RIBOSSOMAL E AO DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO TUMORAL.....	50
1.7. ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM TW.....	52

<b>2. CAPÍTULO 1: Avaliação de alterações moleculares em <i>RPL5</i> e <i>RPL11</i> e seu papel no desenvolvimento e progressão de tumores de Wilms.....</b>	<b>56</b>
2.1. JUSTIFICATIVA.....	56
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
<b>4. CASUÍSTICA E METODOLOGIA .....</b>	<b>58</b>
4.1. COMITÊ DE ÉTICA .....	58
4.2. CASUÍSTICA .....	58
4.2.1. Critérios de inclusão e exclusão.....	58
4.2.2. Variáveis avaliadas.....	58
4.2.3. Seleção das amostras.....	59
4.3. METODOLOGIA.....	60
4.3.1. Revisão anatomopatológica dos casos.....	60
4.3.2. Análises <i>in silico</i> .....	61
4.3.2.1. <i>Dados publicados e depositados em bancos de dados</i> .....	61
4.3.2.2. <i>Sequenciamento de nova geração para expressão gênica - dados prévios do grupo</i> .....	61
4.3.2.3. <i>Sequenciamento de nova geração para avaliação de mutações - dados prévios do grupo</i> .....	63
4.3.2.4. <i>Microarranjo de metilação - dados prévios do grupo</i> .....	64
4.3.2.5. <i>Microarranjo de expressão de miRNAs - dados prévios do grupo</i> .....	65
4.3.3. Coleta e armazenamento das amostras.....	66

4.3.4. Extração de RNA.....	66
4.3.4.1. Avaliação da qualidade e quantificação de ácidos nucleicos.....	67
4.3.4.2. Reação de transcrição reversa (RT) convencional.....	67
4.3.4.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq) convencional.....	68
4.3.4.4. Reação de transcrição reversa (RT) para miRNAs.....	70
4.3.4.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq) para miRNAs.....	70
4.3.5. Extração de proteínas.....	71
4.3.5.1. Western blotting.....	72
4.3.6. Análises estatísticas - Análises de distribuição, grupos e testes adotados.....	73
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>75</b>
5.1. SELEÇÃO DOS CASOS.....	75
5.2. DADOS PRÉVIOS DO GRUPO E VALIDAÇÕES EM AMOSTRAS INDEPENDENTES.....	76
5.2.1. Avaliação do perfil de expressão gênica de <i>RPL5</i> e <i>RPL11</i> .....	76
5.2.1.1. Validação da expressão de <i>RPL5</i> e <i>RPL11</i> por RT-PCRq.....	77
5.2.2. Avaliação do perfil mutacional de <i>RPL5</i> e <i>RPL11</i> .....	81
5.2.3. Avaliação do perfil de metilação de <i>RPL5</i> e <i>RPL11</i> .....	82
5.2.4. Avaliação do perfil de expressão de miRNAs que têm <i>RPL5</i> e <i>RPL11</i> como alvos.....	83

5.2.4.1. Validação da expressão dos miRNAs selecionados.....	85
5.2.5. Avaliação da expressão proteica de RPL5 e RPL11.....	90
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>8. CAPÍTULO 2 – Análises integradas do metaboloma e do transcriptoma de amostras de tumores de Wilms.....</b>	<b>98</b>
8.1. JUSTIFICATIVA.....	98
<b>9. OBJETIVOS.....</b>	<b>99</b>
9.1. OBJETIVO GERAL.....	99
9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	99
<b>10. CASUÍSTICA E METODOLOGIA.....</b>	<b>100</b>
10.1. Seleção de amostras.....	100
10.2. Extração de metabólitos.....	100
10.3. Análise do perfil metabolômico de amostras de TW pelo método UPLC-MS.....	101
10.4. Interpretação dos dados.....	102
10.5. Interpretação dos dados de metaboloma e avaliação de metabólitos identificados associados à via ribossomal.....	104
10.6. Integração dos dados de transcriptoma e metaboloma.....	104
<b>11. RESULTADOS.....</b>	<b>105</b>
11.1. Seleção dos casos.....	105
11.2. Avaliação do metaboloma entre as amostras normais e tumorais e associação dos metabólitos à via ribossomal.....	105
11.3. Avaliação do metaboloma com relação à classificação de risco das amostras.....	108

11.4. Análises do transcriptoma.....	112
11.5. Integração de dados de transcriptoma e metaboloma.....	113
<b>12. DISCUSSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>13. CONCLUSÕES.....</b>	<b>122</b>
<b>14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>123</b>
<b>15. ANEXOS.....</b>	<b>150</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.1:** Critérios para definição dos subtipos histológicos de acordo com o protocolo SIOP, que são os critérios atualmente adotados.....28

**Tabela 1.2** - Comparação entre os critérios de estadiamento para o TW de acordo com as abordagens do SIOP e COG.....31

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.1</b> - Classificação de risco de acordo com os grupos COG e SIOP.....	32
<b>Quadro 4.1</b> - Sequências de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes <i>RPL5</i> , <i>RPL11</i> (genes-alvo) e <i>β-actina</i> (controle interno) na PCRq.....	68
<b>Quadro 5.1</b> - MiRNAs identificados como DE nos dados do microarranjo, que tem os genes <i>RPL5</i> e <i>RPL11</i> como alvos, respectivamente. Os miRNAs em vermelho apresentaram perfil de sub-expressão nas amostras tumorais em relação às normais e os miRNAs em verde, perfil de super-expressão nas amostras tumorais em relação às normais.....	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> - Taxas de incidência de câncer pediátrico ajustadas e específicas por idade (0–14 anos), segundo o SEER/NIH entre os anos de 2009 a 2012 pela Classificação Internacional de Câncer Infantil.....	26
<b>Figura 1.2</b> - Tumor de Wilms e seus componentes histológicos: epitélio, estroma e blastema.....	28
<b>Figura 1.3</b> - Tumor de Wilms com presença de anaplasia, indicadas pelas setas; Tumor de Wilms com restos nefrogênicos perilobares, indicadas pelas setas.....	30
<b>Figura 1.4</b> - Biogênese dos miRNAs pela via canônica.....	40
<b>Figura 1.5</b> - Genes diferencialmente expressos, identificados nas análises de RNA-Seq através das comparações entre as amostras.....	45
<b>Figura 1.6</b> - Resultado do enriquecimento de vias gerado pelo banco de dados KEGG.....	45
<b>Figura 1.7</b> – Composição dos ribossomos e os genes que codificam as proteínas que compõem as subunidades maior e menor.....	47
<b>Figura 1.8</b> - Algumas das funções extra-ribossomais conferidas às proteínas ribossomais (RPs), relacionadas ao câncer.....	48
<b>Figura 1.9</b> - Mecanismo de regulação da biogênese ribossomal e/ou de RPs específicas, por c-MYC e p53, relacionados a alterações de proliferação celular e ao desenvolvimento tumoral.....	50
<b>Figura 4.1</b> - Estratégia de seleção dos casos incluídos no estudo.....	60
<b>Figura 5.1</b> - Distribuição dos casos de tumor de Wilms disponíveis no BNT-INCA, entre as técnicas moleculares realizadas.....	75

<b>Figura 5.2</b> - Avaliação da expressão gênica de <i>RPL5</i> e <i>RPL11</i> em tumores de Wilms para os dados provenientes do RNA-Seq.....	77
<b>Figura 5.3</b> - Avaliação da expressão gênica de <i>RPL5</i> em tumores de Wilms de acordo com o tecido de origem e à presença ou não de recidiva da doença.....	78
<b>Figura 5.4</b> - Avaliação da expressão gênica de <i>RPL5</i> em tumores de Wilms de acordo com a estratificação de risco.....	79
<b>Figura 5.5</b> - Análise da expressão gênica de <i>RPL5</i> em tumores de Wilms de acordo com o estadiamento da doença.....	79
<b>Figura 5.6</b> - Avaliação da expressão gênica de <i>RPL11</i> em tumores de Wilms de acordo com o tecido de origem e à presença ou não de recidiva da doença.....	79
<b>Figura 5.7</b> - Avaliação da expressão gênica de <i>RPL11</i> em tumores de Wilms de acordo com a estratificação de risco e o estadiamento da doença.....	81
<b>Figura 5.8</b> - Análise do perfil de metilação de <i>RPL5</i> e <i>RPL11</i> em tumores de Wilms na região promotora e corpo do gene.....	83
<b>Figura 5.9</b> - Análise da expressão do miR-31-5p que tem o gene <i>RPL5</i> como alvo, em tumores de Wilms, e associação às variáveis clinico-patológicas avaliadas.....	86
<b>Figura 5.10</b> - Análise da expressão do miR-671-5p que tem o gene <i>RPL5</i> como alvo, em tumores de Wilms, e associação às variáveis clinico-patológicas avaliadas.....	88
<b>Figura 5.11</b> - Análise da expressão do miR-140-3p que tem o gene <i>RPL11</i> como alvo, em tumores de Wilms, e associação às variáveis clinico-patológicas avaliadas.....	89
<b>Figura 5.12</b> - <i>Western blotting</i> de extrato protéico total obtido de amostras pareadas (RN e TW) e entre grupos com e sem recidiva da doença, para avaliar o nível de expressão da proteína codificada pelo gene <i>RPL5</i> no qual o gene <i><math>\beta</math>-actina</i> foi utilizado como controle da reação.....	91

<b>Figura 5.13</b> - <i>Western blotting</i> de extrato protéico total obtido de amostras pareadas (RN e TW) e entre grupos com e sem recidiva da doença, para avaliar o nível de expressão da proteína codificada pelo gene <i>RPL11</i> no qual o gene <i>β-actina</i> foi utilizado como controle da reação.....	91
<b>Figura 11.1</b> - Caracterização da variação do metaboloma em TW e RN através do modo negativo de ionização.....	105
<b>Figura 11.2</b> - Caracterização da variação do metaboloma em TW e RN através do modo positivo de ionização.....	106
<b>Figura 11.3</b> - Gráfico representativo das vias metabólicas enriquecidas partindo dos metabólitos identificados em ambos os modos, positivo e negativo de ionização, obtidos pelas análises entre TW e RN, através do banco de dados KEGG.....	107
<b>Figura 11.4:</b> Modelo de previsão de classificação das amostras de acordo com o tecido de origem com base no conjunto de 46 metabólitos pelas análises entre TW vs RN. Curva ROC mostrando a AUROC e IC 95%, do modelo usado para prever as amostras do conjunto de teste. ....	108
<b>Figura 11.5</b> - Caracterização da variação do metaboloma entre as amostras tumorais para avaliação da classificação de risco, considerando o modo positivo de ionização.....	108
<b>Figura 11.6</b> - Caracterização da variação do metaboloma entre as amostras normais para avaliação da classificação de risco, considerando o modo positivo de ionização.....	109
<b>Figura 11.7</b> - Gráfico representativo das vias metabólicas enriquecidas partindo dos metabólitos identificados pelo modo positivo de ionização, obtidos pelas análises entre TW e RN considerando os subgrupos formados associados à classificação de risco, através do banco de dados KEGG.....	110

<b>Figura 11.8</b> - Modelo de previsão da classificação das amostras de acordo com a classificação de risco com base na resultante do conjunto de 22 metabólitos identificados entre todas as amostras de TW e RN. Curva ROC mostrando a AUROC e IC 95%, do modelo usado para prever as amostras do conjunto de teste.....	110
<b>Figura 11.9</b> - Modelo de previsão da classificação das amostras de acordo com a classificação de risco com base na resultante do conjunto de 22 metabólitos identificados, porém considerando somente as amostras tumorais. Curva ROC mostrando a AUROC e IC 95%, do modelo usado para prever as amostras do conjunto avaliado.....	111
<b>Figura 11.10</b> - Modelo de previsão da classificação das amostras de acordo com a classificação de risco com base na resultante do conjunto de 22 metabólitos identificados, porém considerando somente as amostras normais. Curva ROC mostrando a AUROC e IC 95%, do modelo usado para prever as amostras do conjunto avaliado.....	112
<b>Figura 11.11</b> - Gráfico representativo das vias metabólicas enriquecidas partindo da integração dos dados de transcriptoma e de metaboloma entre amostras de TW e RN, através do banco de dados KEGG.....	114

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: Graus *Celsius*

µL: Microlitro

5-FU: 5-fluorouracil

ActD: Actinomicina-D

AdjP: Valores de p ajustado

AUROC: área sob a curva ROC

BH: Benjamini Hochberg

BNT-INCA: Banco Nacional de Tumores do INCA

BSA: Albumina de soro bovino, do inglês, *bovine serum albumin*

cDNA: DNA complementar

COG: Grupo de oncologia infantil, do inglês, *children oncology group*

CSC: Células tronco tumorais, do inglês, *cancer stem cell*

CT: ciclo de *threshold* ou limiar, do inglês, *cycle threshold*

Da: Dalton

DBA: Anemia de Diamond Blackfan

DE: Diferencialmente expresso

DEGs: Genes diferencialmente expressos, do inglês, *differentially expressed genes*

DIPAT-INCA: Divisão de Patologia do INCA

DMPs: Posições diferencialmente metiladas, do inglês, *differentially methylated positions*

DMRs: Regiões diferencialmente metiladas, do inglês, *differentially methylated regions*

EMT: Transição epitélio – mesênquima, do inglês, *epithelial - mesenchymal transition*

ESI: Ionização por *electrospray*, do inglês, *electrospray ionization*

FC: do inglês, *Fold change*

FDR: Taxa de falsas descobertas, do inglês, *False Discovery Rate*

FFPE: Embebido em parafina e fixado em formalina, do inglês *formalin-fixed paraffin-embedded*

FT: Fator de transcrição

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do inglês, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GBTR: Grupo brasileiro de tumores renais

GDEs: Genes diferencialmente expressos

GEO: *Gene Expression Omnibus*

GSEA: Enriquecimento de conjuntos de genes, do inglês, *gene set enrichment analysis*

HE: Hematoxilina-eosina

HMDB: Banco de dados do metaboloma humano, do inglês, *the human metabolome database*

IHQ: Imunohistoquímica

INCA: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

kDa: Kilodalton

KEGG: Enciclopédia de genes e genomas de Kyoto, do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

kV: Kilovolts

LBBC-INCA: Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional do INCA

Limma: Modelos lineares para microarranjo, do inglês, *linear models for microarray*

LINE-1: Elemento nuclear longo intercalado – 1, do inglês, *long interspersed nuclear element- 1*

LLA-T: Leucemia linfocítica aguda de células T

LMA: Leucemia mielóide aguda

LOI: Perda de *imprinting*, do inglês, *loss of imprinting*

MCCV: Validação Cruzada de Monte-Carlo, do inglês, *Monte Carlo Cross Validation*

MET: Metástases

mg: Miligrama

min: Minuto

miRNAs ou miR: microRNAs

mL: Mililitros

MM: Massa molar

mM: Milimolar

MoNA: Banco de dados espectrais de massa da América do Norte, do inglês, *MassBank of North America*

MS: Espectrometria de massas, do inglês, *mass spectrometry*

NADPH: Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo, do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

ng: Nanogramas

nm: Nanômetros

nt: Nucleotídeos

OncomiRs: MiRNAs oncogênicos

PCA: Análise do componente principal, do inglês, *principal component analysis*

PCR: Reação em cadeia da polimerase, do inglês, *polymerase chain reaction*

PCRq: Reação em cadeia da polimerase quantitativa, do inglês, *quantitative polymerase chain reaction*

PLS-DA: Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

pg: Picogramas

ppm: Partes por milhão

QTOF: Quadrupolo e tempo de voo, do inglês, *quadrupole and time of flight*

RIPA: Ensaio de precipitação radioimune, do inglês, *radioimmuno precipitation assay*

RN: Tecido renal normal (córtex) adjacente ao tumor

RNA<sub>m</sub>: RNA mensageiro

ROC: Curva característica de operação do receptor, do inglês, *receiver operating characteristic*

RP: Proteínas ribossomais, do inglês, *ribosomal proteins*

RPL: Proteínas ribossomais da subunidade maior, do inglês *ribosomal proteins large subunit*

rpm: Rotações por minuto

RPS: Proteínas ribossomais da subunidade menor, do inglês, *ribosomal proteins small subunit*

rRNA: RNA ribossômico

RT: Transcrição reversa, do inglês, *reverse transcription*

RT-PCR<sub>q</sub>: Transcrição reversa seguido de reação em cadeia da polimerase quantitativa, do inglês, *reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction*

RTSG: Grupo de estudo de tumores renais, do inglês, *renal tumor study group*

SEER: Programa de epidemiologia e vigilância sanitária dos Estados Unidos, do inglês, *Surveillance, Epidemiology and End Results*

SIOP – Sociedade internacional de oncologia pediátrica, do francês, *Société Internationale d’Oncologie Pédiatrique*

sncRNAs: Pequenos RNAs não codificantes, do inglês *small non coding RNAs*

SNPs: Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês, *single nucleotide polymorphism*

SVM: Vetor de suporte de máquina, do inglês, *Support Vector Machine*

T.A: Temperatura ambiente

TBS: Solução salina tamponada com Tris, do inglês, *Tris buffered saline*

TBS-T: TBS adicionado de Tween 20

TCGA: O atlas do genoma do câncer, do inglês, *The Cancer Genome Atlas*

TW: Tumor de Wilms

UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência, do inglês, *ultra performance liquid chromatography*

UTR: Região não traduzida, do inglês, *untranslated region*

VIP: Importância variável na projeção, do inglês, *Variable Importance in Projection*

WAGR: Tumor de Wilms, aniridia, anomalias geniturinárias, retardo mental

WebGestalt R: do inglês, *WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit*

WT1: Wilms tumor 1



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da**  
**Silva**  
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**Investigação de mecanismos envolvidos com o desenvolvimento de tumores de Wilms.**

**RESUMO**

**Introdução:** Identificar novas alterações moleculares em tumores de Wilms (TWs) é importante não somente para uma melhor compreensão da biologia tumoral, mas para auxiliar na descoberta de novos possíveis biomarcadores, com o intuito de melhorar a estratificação de risco e o tratamento dos pacientes, o que é um grande desafio atualmente. Alterações na via ribossomal, identificada alterada em uma análise prévia de RNA-Seq do grupo e nos genes *RPL5* e *RPL11*, que a compõem; bem como alterações metabólicas a nível global ainda são pouco exploradas em TW. **Objetivo:** Avaliar possíveis alterações moleculares nos genes *RPL5* e *RPL11* e alterações metabólicas em TW e seu papel no desenvolvimento e progressão tumoral. **Casuística e Métodos:** A partir de dados prévios de RNA-Seq de amostras pareadas de tecido do córtex renal normal (RN), do componente blastematoso do tumor primário (TW) e de metástases pulmonares (MET), foi identificada a via ribossomal alterada tanto no TW quanto na MET. Selecionamos os genes diferencialmente expressos *RPL5* e *RPL11* como alvos do estudo, buscando avaliar alterações moleculares nesses genes, através de experimentos em amostras de RN e TW congeladas e armazenadas no Banco Nacional de tumores do INCA (BNT-INCA). Avaliamos a presença de mutações, o perfil de metilação e a expressão diferencial de miRNAs por análises *in silico*. Ainda, foram realizadas análises de expressão gênica e de miRNAs selecionados por RT-PCRq e a avaliação da expressão proteica por *western blotting*. Foi realizada a análise do perfil metabolômico de amostras pareadas de TW e RN por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Por fim, os dados foram associados entre si e às características clínico-patológicas dos pacientes. **Resultados:** Não foram identificadas mutações nem alterações de metilação em ambos os genes. As alterações metabólicas não foram associadas à via ribossomal. Os miRNAs avaliados que têm esses genes como alvos não apresentaram associação aos demais mecanismos avaliados. A expressão de *RPL5* foi associada à classificação de risco (predomínio de blastema), no entanto, essas alterações não impactam a expressão proteica. Para *RPL11*, observamos uma diferença de expressão entre TW e RN nas amostras de avaliadas por RT-PCRq. Também foi observada uma diferença significativa de expressão proteica, no entanto, em níveis opostos. Com relação à metabolômica, foram identificadas alterações significativas entre TW e RN, e ainda, o perfil metabolômico apresentou o potencial de classificar, de forma independente, as amostras de acordo com a classificação de risco dos pacientes. **Conclusão:** De forma geral, assumimos que a via ribossomal, especificamente os genes *RPL5* e *RPL11*, não têm papel relevante no desenvolvimento do TW. Por outro lado, alterações metabólicas podem não apenas estar associadas ao desenvolvimento do tumor, mas serem potenciais biomarcadores a serem explorados com utilidade clínica para pacientes com TW. **Palavras-chave:** tumor de Wilms, integração de dados, via ribossomal, *RPL5*, *RPL11*, metabolômica, classificação de risco.



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da**  
**Silva**  
**Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**Investigation of mechanisms involved in the development of Wilms tumors**

**ABSTRACT**

**Introduction:** Identifying new molecular alterations in Wilms tumors (WTs) is important not only for a better understanding of tumor biology, but to improve the discovery of new possible biomarkers, in order to improve risk stratification and treatment of patients, which is a challenge actually. Alterations in the ribosomal pathway, identified altered in a previous analysis of RNA-Seq of the group and in the *RPL5* and *RPL11* genes, which compose it; as well as metabolic alterations at a global level, are still poorly explored in TW. **Objective:** To evaluate possible molecular alterations in the *RPL5* and *RPL11* genes and metabolic alterations in WT and their role in tumor development and progression. **Material and Methods:** From previous RNA-Seq data from paired samples of tissue from normal renal cortex (NK), the blastemal component of primary tumor (WT) and pulmonary metastases (MET), the ribosomal pathway was identified altered in both WT and MET. We selected the differentially expressed genes *RPL5* and *RPL11* as targets of our study, aiming to evaluate molecular alterations in these genes, through molecular analysis in fresh-frozen tissues from NK and WT samples stored at the National Tumor Bank of INCA (BNT-INCA). We evaluated the presence of mutations, the methylation profile and the differential expression of miRNAs by *in silico* analysis. Furthermore, analyzes of gene expression and selected miRNAs were performed by RT-qPCR and the evaluation of protein expression by *western blotting*. The analysis of the metabolomic profile of paired samples of WT and NK was performed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Finally, the data were associated with each other and with the clinical-pathological characteristics of the patients. **Results:** No mutations or alterations in DNA methylation were identified in both genes. Metabolic alterations were not associated with the ribosomal pathway. The miRNAs evaluated that have these genes as targets were not associated with the other mechanisms evaluated. *RPL5* expression was associated with risk classification (blastemal predominance), however, these alterations do not impact protein expression. For *RPL11*, we observed a difference in expression between WT and NK in samples evaluated by RT-qPCR. A significant difference in protein expression was also observed, however, at opposite levels. Regarding metabolomics, significant changes were identified between WT and NK, and the metabolomic profile had the potential to, independently, classify the samples according to the risk classification of patients. **Conclusion:** We assume that the ribosomal pathway, specifically the *RPL5* and *RPL11* genes, does not play a relevant role in WT development. On the other hand, metabolic alterations may not only be associated with tumor development, but also be potential biomarkers to be explored with clinical utility for patients with WT. **Keywords:** Wilms tumor, data integration, ribosomal pathway, *RPL5*, *RPL11*, metabolomics, risk classification.

## 1. INTRODUÇÃO

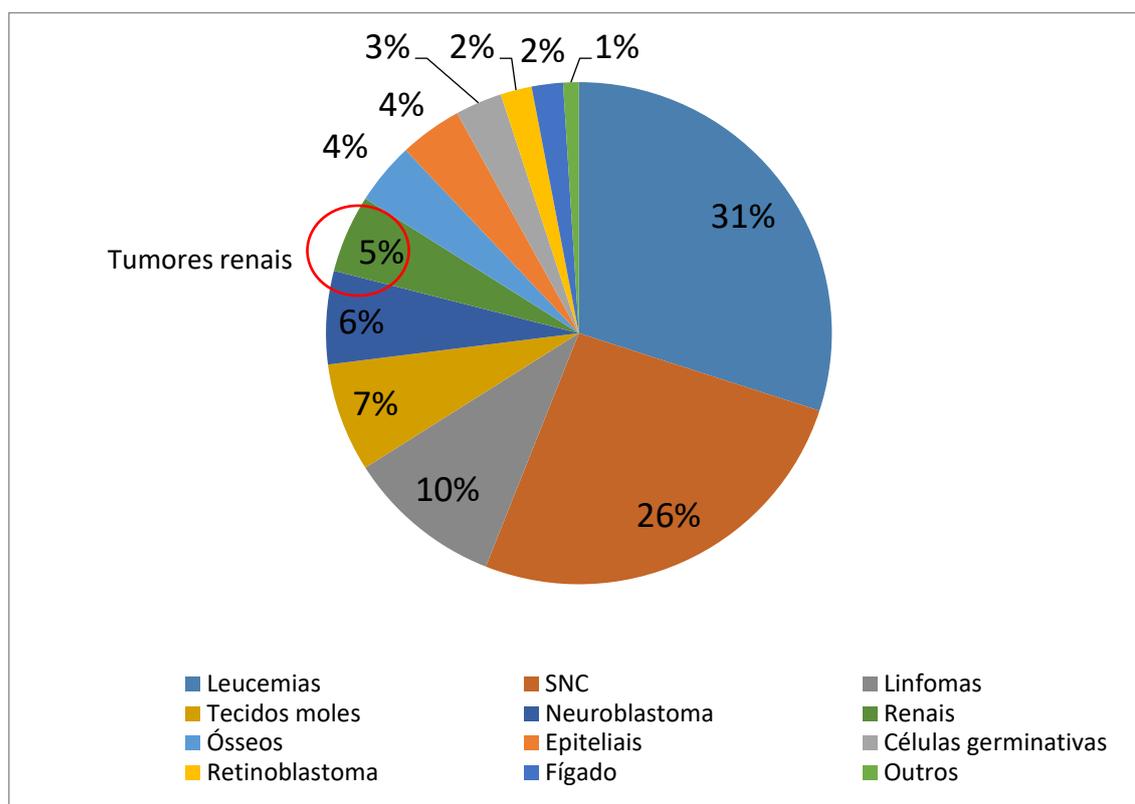
### 1.1 TUMOR DE WILMS (TW) – ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

O câncer infanto-juvenil (entre 0 e 19 anos) consiste em um conjunto de doenças que apresentam características próprias, e se diferenciam dos tumores de adultos por fatores importantes, tais como o local primário acometido, origem histológica (tumores infantis geralmente apresentam origem embrionária), e comportamento clínico (maiores taxas de proliferação celular, crescimento e invasividade em contraste com melhores taxas de resposta ao tratamento e sobrevida) (MURPHY *et al.*, 2013)(INCA, 2016). Em termos globais, o câncer pediátrico corresponde de 1% a 4% de todas as neoplasias, com incidências que tenderam ao aumento em todo o mundo ao longo das últimas décadas (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018)(HUBBARD *et al.*, 2019) (INCA, 2019)(SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). Em 2017, ocorreram 2.553 óbitos por câncer em crianças, o que corresponde a 7,5% entre todas as causas, sendo a segunda maior causa de morte em todas as regiões do país (INCA, 2019). Estima-se que, para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, ocorrerão aproximadamente 4.310 novos casos no sexo masculino e 4.150 no sexo feminino em crianças e adolescentes, até os 19 anos de idade (INCA, 2019).

De acordo com a Sociedade Americana de Câncer (ACS do inglês, *American Cancer Society*), a incidência global de câncer infantil tem aumentado ligeiramente desde 1975, com uma tendência de estabilização nos últimos anos. Por outro lado, as taxas de mortalidade nesse grupo entre os anos de 1970 e 2017 diminuíram em cerca de 65%, com melhora das taxas de sobrevida relativa de cinco anos para todos os cânceres combinados. No entanto, a sobrevida varia substancialmente de acordo com o tipo de câncer e idade ao diagnóstico (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018)(SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

Segundo dados divulgados pelo Programa de Epidemiologia e Vigilância Sanitária dos Estados Unidos (SEER, do inglês, *Surveillance, Epidemiology and End Results*), entre os anos de 1975 a 2017, as leucemias foram responsáveis por 31% de todos os cânceres infantis, seguidas por tumores do Sistema Nervoso Central (26%), linfomas e neoplasias reticuloendoteliais (como o linfoma não-Hodgkin, 10%), tumores de partes moles (como sarcomas, 7%), neuroblastoma (6%), seguido pelos tumores renais, grupo no qual se inclui o TW, representando 5% de todos os tumores pediátricos (HOWLADER *et al.*, 2020) (**Figura 1.1**). Índices similares são observados

no Brasil, com algumas variações nas frequências observadas para cada tipo de tumor (INCA, 2019).



**Figura 1.1** - Taxas de incidência de câncer pediátrico ajustadas e específicas por idade (0–14 anos), segundo o SEER/NIH entre os anos de 2009 a 2012 pela Classificação Internacional de Câncer Infantil. (Adaptado de: PDQ Cancer Information Summaries 2017. Disponível em [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65876/figure/CDR0000062872\\_\\_1341](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65876/figure/CDR0000062872__1341)).

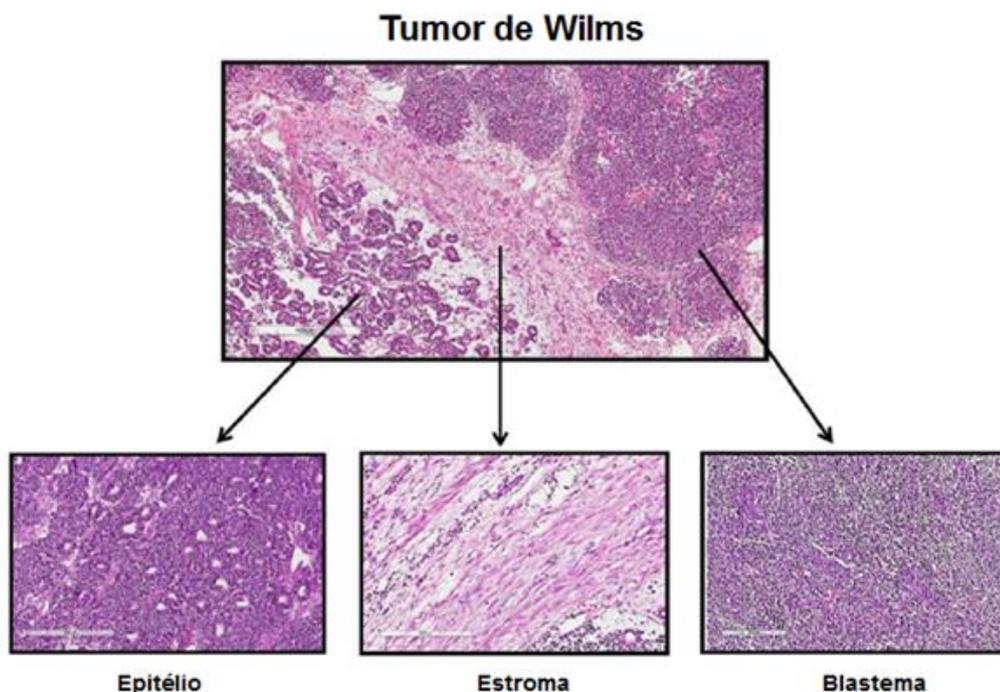
Os tumores renais pediátricos compreendem um espectro de subtipos morfológicos, incluindo tumores de histopatologia benigna. Algumas formas mais raras de câncer renal na infância incluem o sarcoma renal de células claras, tumor rabdóide renal, tumor renal cístico multilocular, carcinoma de células renais e angiomiolipoma (GELLER; SMERGEL; LOWRY, 1997)(CHARLES; VUJANIĆ; BERRY, 1998)(VUJANIĆ; CHARLES, 2008). O TW, também denominado de nefroblastoma, é o principal tumor renal pediátrico maligno mais comum, compreendendo aproximadamente 95% dos cânceres renais diagnosticados em crianças menores de 15 anos de idade. Suas maiores incidências são observadas nos primeiros dois anos de vida, com taxas decrescentes conforme o aumento da idade, e incidências muito baixas entre 10 - 19 anos (RIES *et al.*, 1999)(HECK *et al.*, 2019). No Brasil, a taxa mediana de incidência anual ajustada por idade é de aproximadamente 9,4 casos por milhão, variando por região geográfica (DE

CAMARGO *et al.*, 2011). A maioria dos casos de TW são esporádicos (~98%) e unilaterais (90-95%), enquanto a doença bilateral ocorre em aproximadamente 5% dos pacientes. Cerca de 2% dos pacientes com TW têm histórico familiar (RUTESHOUSER; HUFF, 2004)(PRITCHARD-JONES, KATHY; DOME, 2014). Pacientes com tumores bilaterais são geralmente diagnosticados mais precocemente e podem ter anormalidades de desenvolvimento mais frequentemente associadas, em comparação àqueles pacientes com formas unilaterais da doença (WIKSTRÖM; PARKKULAINEN; LOUHIMO, 1982)(RIVERA, MIGUEL; HABER, 2005). Alterações germinativas no gene *WT1* e alterações epigenéticas que afetam o *locus* 11p15 foram associadas a um aumento de risco de desenvolver o TW (MACIASZEK; OAK; NICHOLS, 2020), bem como certas anomalias congênitas e condições genéticas que aumentam a susceptibilidade para o desenvolvimento do tumor. Dentre elas, podemos destacar a Síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de WAGR (TW, aniridia, anomalias geniturinárias, retardo mental), síndrome de Perlman, síndrome de Denys Drash, síndrome de Golabi-Behmel, dentre outras (BRESLOW, NORMAN *et al.*, 1996)(SCOTT, 2006)(BROK *et al.*, 2016) (CAPASSO *et al.*, 2020) (LIU, ESTHER K.; SUSON, 2020). Por outro lado, algumas malformações não-sindrômicas também estão associadas ao TW, incluindo supercrescimento assimétrico (hemi-hipertrofia) e anormalidades geniturinárias (DUMOUCEL *et al.*, 2014).

## 1.2 - ASPECTOS HISTOLÓGICOS E TRATAMENTO

Os TWs apresentam histologia trifásica, compostos por células epiteliais, estromais e blastematosas em proporções variáveis (BECKWITH *et al.*, 1996)(PERLMAN, 2005) (**Figura 1.2**). O componente epitelial é caracterizado por apresentar o espectro de diferenciação renal, com estruturas epiteliais primitivas semelhantes a rosetas, que formarão os túbulos renais ou estruturas semelhantes a glomérulos, refletindo os diferentes estágios da nefrogênese. O componente estromal é composto por células mesenquimais que podem se transformar em células de músculo esquelético, tecido adiposo, cartilagem ou osso devido à diferenciação heteróloga do estroma neoplásico, principalmente em tumores submetidos à quimioterapia pré-operatória. Além disso, este também é o componente com menores índices de proliferação e resposta à quimioterapia. O componente blastematoso representa o tipo celular menos diferenciado caracterizado por pequenas células azuis

redondas com núcleos sobrepostos e rápida atividade mitótica (POPOV; SEBIRE; VUJANIC, 2016).



**Figura 1.2** - Tumor de Wilms e seus componentes histológicos: epitélio, estroma e blastema. (Fonte: Arquivo DIPAT – INCA. HE 10x imagem superior; HE 40x imagens inferiores).

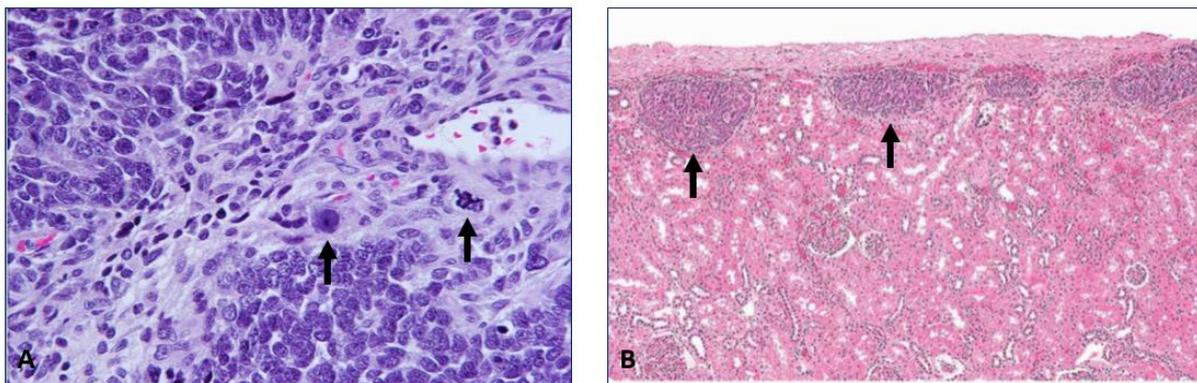
Quando o componente blastematoso persiste após a quimioterapia, este é um indicador de resistência ao tratamento e altamente significativo de possível recorrência tumoral e prognóstico adverso em TW (WEIRICH *et al.*, 2001)(DINIZ, 2016)(POPOV; SEBIRE; VUJANIC, 2016). Alguns protocolos adotam a porcentagem de blastema residual para estratificação de risco (**Tabela 1.1**); no entanto, estudos atuais têm avaliado o volume de blastema residual absoluto como novo fator prognóstico a ser implementado pelos protocolos para direcionar o tratamento. Dessa forma, tumores que apresentem volumes residuais de blastema superiores a 20 mL serão classificados como de alto risco, e receberão um tratamento mais intensivo. No entanto, recomenda-se que a determinação do volume residual de blastema seja feita associada a uma revisão patológica central, a exames de imagem e bancos de dados de alta qualidade, o que é um fator que dificulta a implementação desse protocolo em algumas instituições (VUJANIĆ *et al.*, 2018).

**Tabela 1.1:** Critérios para definição dos subtipos histológicos de acordo com o protocolo SIOP, que são os critérios atualmente adotados.

Classificação do tumor*	Alterações induzidas pelo tratamento (%)	Características histológicas (% de tumor viável)		
		Blastema	Epitélio	Estroma
Completamente necrótico	100	0	0	0
Regressivo	>66	0-100	0-100	0-100
Misto	<66	0-65	0-65	0-65
Misto	<66	11-65	0-89	0-89
Epitelial	<66	0-10	66-100	0-33
Estromal	<66	0-10	0-33	66-100
Blastematoso	<66	66-100	0-33	0-33

(Fonte: Adaptado de Vujanic et al, 2018). \*A presença de anaplasia difusa em qualquer um dos tipos de tumor classifica os subtipos automaticamente como anaplásicos (alto risco).

Outra característica histológica importante para classificação de risco e tratamento é a presença de anaplasia difusa na peça tumoral, que ocorre entre 5-8% dos casos de TW (DOME *et al.*, 2006). Esse tipo celular é definido por três características: células mitóticas multipolares, aumento nuclear de pelo menos três vezes o diâmetro celular normal e células tumorais com núcleo hiper cromático, e pode estar presente em qualquer dos três componentes histológicos (BECKWITH, J. B.; PALMER, 1978)(FARIA *et al.*, 1996). A presença de anaplasia difusa classifica o tumor como histologia desfavorável ou alto risco (a depender do protocolo), sendo considerado um fator de pior prognóstico, altamente associado a maiores índices de recidiva e piores taxas de sobrevida (BONADIO *et al.*, 1985)(ZUPPAN; BECKWITH; LUCKEY, 1988)(VUJANIC *et al.*, 1999). Ainda, alguns TWs podem apresentar focos de células embrionárias, resultado da diferenciação incompleta do rim, denominados restos nefrogênicos, classificados em perilobares (presentes na periferia do lóbulo renal) ou intralobares (presentes em todo o lóbulo renal) e são células caracterizadas como precursoras do TW (BECKWITH; KIVIAT; BONADIO, 1990)(YOUNG *et al.*, 2018) (**Figura 1.3**).



**Figura 1.3** - A. Tumor de Wilms com presença de anaplasia, indicadas pelas setas (HE, 40x) B. Tumor de Wilms com restos nefrogênicos perilobares, indicadas pelas setas (HE, 10x). (Fonte: Arquivo DIPAT – INCA.)

O tratamento do TW é sempre multidisciplinar, com cirurgia e quimioterapia, além de radioterapia em casos específicos. Atualmente, os fatores prognósticos considerados mais relevantes para a decisão terapêutica são o estadiamento e a histologia da peça tumoral (KASTE *et al.*, 2008)(DOME; PERLMAN; GRAF, 2014b). Outros fatores prognósticos incluem idade ao diagnóstico, volume tumoral e resposta inicial ao tratamento (BRESLOW, NORMAN E. *et al.*, 2006)(SPREAFICO *et al.*, 2009)(FURTWÄNGLER *et al.*, 2011)(TANG *et al.*, 2019).

O TW é um exemplo de sucesso terapêutico, o que se deve aos grupos cooperativos multidisciplinares que estudam esse tipo de tumor: o grupo internacional estabelecido na Europa, do qual o Brasil faz parte, denominado *Renal Tumor Study Group – Société Internationale d’Oncologie Pédiatrique* (RTSG-SIOP) e o grupo norte-americano, o *Children Oncology Group* (COG; anteriormente denominado *National Wilms Tumor Study Group – NWTSG*). O protocolo adotado pelo grupo internacional SIOP preconiza quimioterapia inicial (com ou sem biópsia para determinar a histologia tumoral), com o intuito de diminuir o volume tumoral evitando assim a ruptura do tumor além de identificar aqueles pouco ou não responsivos à quimioterapia. Em seguida, é realizada cirurgia e quimioterapia adjuvante e / ou radioterapia, sendo este o protocolo seguido pelo Grupo Brasileiro de Tumores Renais (GBTR). Estadiamento e estratificação de risco são feitos após a cirurgia inicial (“Paediatric renal tumours: perspectives from the SIOP–RTSG”, 2017). Por outro lado, o protocolo seguido pelo COG adota a nefrectomia inicial seguida de quimioterapia e / ou radioterapia adjuvante, se necessário, e o estadiamento da doença é realizado após a cirurgia

(FERNANDEZ, 2014). Ambos os protocolos apresentam semelhantes e excelentes sobrevidas global e livre de doença (IRTAN; EHRLICH; PRITCHARD-JONES, 2016). Embora existam algumas diferenças na abordagem terapêutica e nos critérios para estadiamento (**Tabela 1.2**) e classificação de risco (**Quadro 1.1**), esses grupos conduziram uma série de estudos clínicos e moleculares bem desenhados que forneceram um grande corpo de conhecimento baseado em evidências para estabelecer os melhores tratamentos para crianças com TW. Com os avanços terapêuticos, as taxas de sobrevida global de pacientes com TW chegam a aproximadamente 90% (SZYCHOT; APPS; PRITCHARD-JONES, 2014). No entanto, a sobrevida global de subgrupos específicos de pacientes, como os de histologia desfavorável, doença bilateral e recidiva da doença permanece em torno de 50%. Juntos, estes grupos de maior risco representam cerca de 20% dos pacientes com TW (DOME *et al.*, 2015)(PRITCHARD-JONES, *et al.*, 2015).

**Tabela 1.2** - Comparação entre os critérios de estadiamento para o TW de acordo com as abordagens do SIOP e COG.

Estadiamento	SIOP	COG
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tumor limitado ao rim ou circundado por pseudocápsula fibrosa se fora dos contornos normais do rim, a cápsula renal ou pseudocápsula pode ser infiltrada com o tumor, mas não atinge a superfície exterior, e é completamente ressecado (margens de ressecção “limpas”).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tumor limitado ao rim e é completamente ressecado</li> </ul>
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>O tumor se estende além do rim ou penetra através da cápsula renal e/ou pseudocápsula fibrosa na gordura perirrenal, mas é completamente ressecado (margens de ressecção “limpas”).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tumor se estende além do rim, mas completamente ressecado</li> </ul>
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>Excisão incompleta do tumor que se estende além das margens de ressecção (tumor macroscópico ou microscópico permanece no pós-operatório);</li> <li>Quaisquer linfonodos abdominais estão envolvidos;</li> <li>A presença de tumor necrótico ou alterações induzidas por quimioterapia em um linfonodo ou nas margens de ressecção deve ser considerado como estágio III.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tumor residual ou metástases não hematogênicas confinado ao abdômen;</li> <li>Nódulos abdominais envolvidos.</li> </ul>
IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Metástases hematogênicas disseminadas além do abdômen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Metástases hematogênicas disseminadas além do abdômen.</li> </ul>
V	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tumores renais bilaterais.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tumores renais bilaterais.</li> </ul>

Fonte: (Adaptado de DOME; PERLMAN; GRAF, 2014b).

**Quadro 1.1** - Classificação de risco de acordo com os grupos COG e SIOP

<b>COG</b>	<b>SIOP</b>
<b><i>Histologia favorável</i></b> Sem evidência de anaplasia.	<b><i>Baixo risco</i></b> TW completamente necrótico
<b><i>TW com anaplasia focal</i></b> Anaplasia confinada a um ou mais locais definidos dentro do tumor primário sem envolvimento extra renal; Sem restos nefrogênicos fora dos focos anaplásicos.	<b><i>Risco intermediário</i></b> TW subtipo epitelial, estromal, misto ou regressivo; TW com anaplasia focal (segue mesmas definições do COG)
<b><i>TW com anaplasia difusa</i></b> Anaplasia não-localizada, com sítios invasivos ou depósitos extra renais; Anaplasia localizada com restos nefrogênicos; Anaplasia em amostras de biópsia aleatórias, envolvendo uma ou mais áreas.	<b><i>Alto risco</i></b> TW com predomínio de blastema; TW com anaplasia difusa (segue mesmas definições do COG)

Fonte: (DOME; PERLMAN; GRAF, 2014b).

Pacientes classificados em estadiamento IV apresentam, ao diagnóstico, metástase hematogênica no pulmão (mais comum), fígado, osso, cérebro, linfonodos extra-abdominais ou outros locais (VAN DEN HEUVEL-EIBRINK *et al.*, 2017)(BROK *et al.*, 2018); e são tratados com uma abordagem terapêutica mais intensiva por ambos os protocolos (COG e SIOP) (SZYCHOT; APPS; PRITCHARD-JONES, 2014). Pacientes que apresentam recidiva à distância ou localizada no abdômen durante ou após o final do tratamento (mas não ao diagnóstico) são considerados recidivas da doença. Nesses casos, as abordagens terapêuticas tendem a incluir medicamentos não utilizados no tratamento primário (OOSTVEEN; PRITCHARD-JONES, 2019). De forma geral, a recidiva ocorre em até dois anos após a nefrectomia, sendo que o risco absoluto de recidiva é semelhante para todos os estágios do tumor e subgrupos histológicos (BROK *et al.*, 2018). Pacientes recidivados apresentam um pior prognóstico quando comparados a pacientes que apresentam metástase ao

diagnóstico. Para aqueles com recidiva da doença, a sobrevida permanece em torno de 50%, enquanto para os pacientes metastáticos ao diagnóstico, essa sobrevida pode chegar a cerca de 90%, a depender da classificação de risco do paciente (pacientes alto risco têm pior prognóstico comparado aos de risco baixo ou intermediário) (PRITCHARD-JONES, 2002)(SPREAFICO; BELLANI, 2006) (SPREAFICO *et al.*, 2009)(BROK *et al.*, 2018)(DIX *et al.*, 2018).

O tratamento padrão de TW inclui o uso de vincristina, actinomicina-D (ActD) e doxorrubicina. Para os grupos de alto risco, pacientes com doença metastática ao diagnóstico ou que apresentam recidiva ou resistência ao tratamento, também podem ser administrados ciclofosfamida, carboplatina, etoposido e irinotecano, de acordo com o protocolo adotado pela instituição (SZYCHOT; APPS; PRITCHARD-JONES, 2014)(BROK *et al.*, 2016).

Além disso, pacientes com TW tratados podem apresentar efeitos adversos tardios como doenças cardíacas, hepáticas, complicações durante a gravidez e risco de desenvolver neoplasias primárias subsequentes (GREEN *et al.*, 2010)(TERMUHLEN *et al.*, 2011)(WONG *et al.*, 2016). Sendo assim, o objetivo principal dos estudos que vêm sendo desenvolvidos é identificar marcadores que permitam individualizar o tratamento, reduzindo ou intensificando-o, diminuindo a morbidade dos tratamentos e as taxas de recidiva da doença, além de aumentar as taxas de cura e sobrevida desses pacientes (SONN; SHORTLIFFE, 2008)(VAN DEN HEUVEL-EIBRINK *et al.*, 2017).

### **1.3. BIOLOGIA DOS TWs**

#### **1.3.1. Alterações genéticas em TW**

Uma característica marcante dos TWs, assim como em outros tumores embrionários, é a frequência relativamente baixa de mutações somáticas, detectadas em até 30% dos casos, envolvendo cerca de 30 genes. Dentre estes, os mais frequentemente alterados são: *WT1*, *CTNNB1*, *AMER1 (WTX)*, *DROSHA*, *DGCR8*, *XPO5*, *DICER1*, *SIX1*, *SIX2*, *MLLT1*, *MYCN* e *TP53* (SCOTT *et al.*, 2012)(GADD *et al.*, 2017)(MAHAMDALLIE *et al.*, 2019).

O *WT1 (Wilms tumor 1)* foi o primeiro gene associado ao TW, identificado em pacientes com síndrome de WAGR (Tumor de Wilms, anidria, anomalias geniturinárias, retardo mental) com deleção da região cromossômica 11p13 (CALL *et*

*al.*, 1990)(HABER *et al.*, 1990), e está relacionado ao processo de desenvolvimento renal (KREIDBERG *et al.*, 1993)(MOORE AW *et al.*, 1999)(KREIDBERG, 2010). Mutações germinativas ou somáticas em *WT1* são encontradas em 5 a 15% dos casos de TW (GESSLER *et al.*, 1994)(RIVERA, MIGUEL N.; HABER, 2005)(CHARLTON; PRITCHARD-JONES, 2016), sendo que mutações germinativas em *WT1* são geralmente identificadas em pacientes com tumores bilaterais e em idades mais precoces (AL-HUSSAIN; ALI; AKHTAR, 2014). No entanto, apenas alterações em *WT1* não são suficientes para o desenvolvimento do TW. A maioria dos tumores com mutações neste gene também apresentam mutações de ganho de função em *CTNNB1*, que codifica a  $\beta$ -catenina, uma proteína que participa da via de sinalização Wnt. Diversos membros da família Wnt foram implicados na nefrogênese, além de ser uma das múltiplas vias de sinalização que participa do início e progressão da transição epitélio - mesênquima (EMT, do inglês, *epithelial - mesenchymal transition*) (POPOV; SEBIRE; VUJANIC, 2016)(HUANG *et al.*, 2016)(DUHME *et al.*, 2021). Cerca de 15% dos casos esporádicos de TW apresentam mutações em *CTNNB1*, dos quais aproximadamente 75% apresentam concomitantemente mutações em *WT1* (HUFF, 2011), descrito como um inibidor da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (CHANG *et al.*, 2008). Neste contexto, *WT1* e *CTNNB1* apresentam atividades antagônicas, e mutações em ambos os genes estão diretamente associadas a alterações no desenvolvimento renal embrionário por ativação da EMT (CORBIN *et al.*, 2009).

A desregulação da via de sinalização de  $\beta$ -catenina também está associada a mutações em *AMER1* (anteriormente denominado *WTX*) em até 30% dos casos (SCOTT *et al.*, 2012)(ALEXANDRESCU *et al.*, 2017). Este gene atua como um regulador negativo da via Wnt /  $\beta$  -catenina (RIVERA *et al.*, 2007) e suas mutações geralmente levam à perda do sítio de ligação a essa proteína. Assim, a ubiquitinação e posterior degradação de  $\beta$ -catenina é evitada, resultando no aumento dos seus níveis no citoplasma e consequente translocação para o núcleo e ativação da via Wnt (MAJOR *et al.*, 2007)(HUFF, 2011). Além disso, *AMER1* sofre *splicing* alternativo e uma de suas variantes pode se translocar para o núcleo, onde se liga a *WT1*, levando ao aumento da sua atividade transcricional (RIVERA *et al.*, 2009) indicando que *AMER1* desempenha também um papel importante no desenvolvimento renal. Foi demonstrado que *AMER1* interage com p53, reforçando o seu papel na parada do ciclo celular e apoptose (KIM *et al.*, 2012).

*TP53* é um gene supressor tumoral localizado em 17p13.1, que codifica a proteína p53, associado a funções que afetam praticamente todas as características envolvidas no desenvolvimento de câncer (conhecidos como os *hallmarks* - ou marcas registradas - do câncer), como proliferação, apoptose e reparo de DNA (HANAHAN; WEINBERG, 2011)(AUBREY; STRASSER; KELLY, 2016). Apesar de mutações somáticas em *TP53* serem incomuns em tumores infantis, já foram descritos mais de 200 SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) associados à predisposição ao câncer (WHIBLEY; PHAROAH; HOLLSTEIN, 2009). Mutações somáticas em *TP53* e/ou perdas de 17p são identificadas em aproximadamente 5% dos TWs esporádicos, particularmente em pacientes que vão a óbito, enquanto essas alterações são descritas em até 60% dos casos de TWs com anaplasia difusa, relacionadas à resistência ao tratamento, maior risco de recorrência e morte, particularmente em estágios avançados do tumor. Ainda, foi demonstrado que cerca de 20% dos TWs com predomínio de blastema apresentam alterações em *TP53* (BARDEESY *et al.*, 1994)(MASCHIETTO *et al.*, 2014)(OOMS *et al.*, 2016)(WEGERT *et al.*, 2017).

O *MYCN* codifica um fator de transcrição proto-oncogênico da família MYC. Ganho de número de cópias de *MYCN* foi identificado principalmente em TW com anaplasia difusa e com predomínio de blastema, associado à pior sobrevida livre de recidiva; tornando este gene um possível alvo para futuras pesquisas envolvendo novas abordagens terapêuticas (WILLIAMS *et al.*, 2011)(WILLIAMS *et al.*, 2015)(DENG *et al.*, 2016). Além disso, a expressão de *MYCN* está correlacionada com a alta expressão de *SIX1* e *SIX2*, associadas ao alto potencial proliferativo de tumores do tipo blastematoso (WEGERT *et al.*, 2015).

*SIX1* e *SIX2* são importantes fatores de transcrição (FTs) associados ao desenvolvimento renal e à iniciação do TW, sendo que alterações nesses genes podem levar à perda de diferenciação celular e aumento de proliferação de células blastematosas (YU; MCMAHON; VALERIUS, 2004)(PODE-SHAKKED *et al.*, 2012). Mutações somáticas em *SIX1* e *SIX2* foram detectadas em cerca de 10% dos casos de TW analisados, predominantemente em tumores do tipo blastematoso e, geralmente, essas alterações ocorrem em um único resíduo de aminoácido que afeta a ligação ao DNA, apontando um papel regulatório destes genes (SEHIC *et al.*, 2012)(SENANAYAKE *et al.*, 2013)(WEGERT *et al.*, 2015). Ambos foram identificados alterados juntamente com mutações somáticas em genes da maquinaria de processamento de microRNAs (miRNAs), como *DROSHA*, *DGCR8*, *DICER1* e *XPO5*,

principalmente em TWs com predomínio do componente blastematoso. Em conjunto, alterações nesses genes são detectadas entre 2,5 a 12% dos casos de TWs esporádicos. Mutações em genes envolvidos na biogênese e processamento de miRNAs levam à diminuição global de miRNAs, associada ao desenvolvimento e recaída de TW. Esses genes são candidatos a “*drivers*” de TW do tipo blastematoso, uma vez que essas mutações podem favorecer a evasão de células precursoras renais imaturas ao final do ciclo de diferenciação celular e, conseqüentemente, à proliferação contínua de células precursoras do tipo blastematoso (RAKHEJA *et al.*, 2014a)(TORREZAN *et al.*, 2014)(WALZ *et al.*, 2015)(WEGERT *et al.*, 2015) (GADD *et al.*, 2017)(CICERI *et al.*, 2020). Estes estudos trouxeram a possibilidade de uma melhor definição de casos de alto risco com base nesses genes candidatos, visando uma redução na intensidade do tratamento para subtipos que têm um melhor prognóstico.

Um estudo identificou o gene *MLLT1*, envolvido no processo de transcrição durante o desenvolvimento renal inicial, mutado em TWs de histologia favorável, detectado em cerca de 4% dos pacientes analisados. Além das mutações em *MLLT1*, os tumores apresentaram concomitantemente super-expressão de *MYCN*. Pacientes com alteração em *MLLT1* desenvolveram o tumor mais precocemente e apresentaram uma alta prevalência de restos nefrogênicos, indicando que mutações nesse gene estão associadas ao desenvolvimento do TW (PERLMAN *et al.*, 2015). Além destes genes, foram descritas mutações em *BCOR*, *BCORL1*, *NONO*, *MAX*, *COL6A3*, *ASXL1*, *MAP3K4* e *ARID1A*, em frequências abaixo de 3,8% na coorte analisada (GADD *et al.*, 2017).

Por fim, algumas alterações de número de cópias têm sido frequentemente descritas em TW, como ganho do cromossomo 1q e perda de heterozigosidade de 1p e 16q. O ganho de 1q, identificado em cerca de 28% dos TWs, tem sido avaliado para ser implementado como biomarcador de pior prognóstico, em adição ao perfil histológico, por ambos os protocolos COG e SIOP, visando alterações no tratamento desses pacientes, com abordagem terapêutica mais intensiva (SKOTNICKA-KLONOWICZ *et al.*, 2000)(HING *et al.*, 2001)(GRUNDY *et al.*, 2005)(CHAGTAI *et al.*, 2016)(GRATIAS *et al.*, 2016).

### **1.3.2. Alterações epigenéticas em TW**

Cerca de 70% dos TWs têm alterações de *imprinting* no *locus* 11p15 (SCOTT *et al.*, 2012) associadas a outras alterações epigenéticas, como alterações de metilação do DNA, na maquinaria de biossíntese de miRNAs e modificações de histonas. Todos esses são processos que, quando desregulados, podem contribuir para o desenvolvimento e progressão de uma série de tumores sólidos pediátricos, incluindo os TWs (BAYLIN; JONES, 2011)(LAWLOR; THIELE, 2012).

### **1.3.2.1. Alterações do padrão de metilação do DNA**

A metilação do DNA é um processo que envolve a transferência de um grupo metil para o carbono 5 de uma citosina seguidas de guanina (sítios CpG) para formar a 5-metilcitosina. A metilação do DNA regula a expressão gênica recrutando proteínas envolvidas na inibição da expressão gênica ou inibindo a ligação de fatores de transcrição ao DNA. Durante o desenvolvimento, o padrão de metilação do DNA no genoma muda como resultado de um processo dinâmico envolvendo tanto a metilação quanto a desmetilação do DNA. Como consequência, as células diferenciadas desenvolvem um padrão de metilação de DNA estável e único que regula a transcrição de genes específicos do tecido (MOORE; LE; FAN, 2013).

A associação entre metilação de sítios CpG e câncer é bem estabelecida. De forma geral, tumores apresentam hipometilação global do DNA em comparação aos tecidos adjacentes normais (WILSON; POWER; MOLLOY, 2007), característica muitas vezes associada à maior agressividade e menor sobrevida dos pacientes (EHRlich *et al.*, 2002)(ITANO *et al.*, 2002)(WIDSCHWENDTER *et al.*, 2004)(DE SÁ PEREIRA *et al.*, 2017). Essas observações podem ser explicadas, ao menos em parte, pela associação entre hipometilação global e instabilidade genômica (JONES; GONZALGO, 1997)(SCHMUTTE; JONES, 1998)(HERMAN, 1999). A hipometilação de regiões promotoras de proto-oncogenes resulta em sua super-expressão; bem como a hipermetilação dessas regiões em genes supressores tumorais levam à sua inativação transcricional, exemplificando a associação entre metilação do DNA, regulação da expressão gênica e desenvolvimento tumoral. Genes regulados por metilação, como alguns da família HOX e alguns supressores tumorais como *LTF*, *SUSD2*, *HNF4A*, *TNFRSF10A*, e *H19* foram descritos como envolvidos na progressão dos TWs (GUERRA *et al.*, 2019a).

A identificação de um padrão de *imprinting* aberrante na região 11p15 foi uma das primeiras alterações de metilação do DNA associadas ao TW (WILLIAMS *et al.*,

1992). Nessa região, estão localizados os genes *IGF2*, que codifica um fator de crescimento embrionário; e *H19*, que expressa um RNA não codificante que funciona como um supressor tumoral. Em condições normais, *IGF2* é expresso apenas pelo alelo paterno, enquanto *H19* é expresso apenas pelo alelo materno. A perda de *imprinting* (LOI, do inglês “*loss of imprinting*”) de 11p15 pode resultar em superexpressão de *IGF2* devido à ativação do alelo materno normalmente reprimido. Em alguns casos, a LOI pode ocorrer devido à perda do alelo materno, com uma substituição pelo alelo paterno duplicado (dissomia uniparental ou UPD, do inglês “*uniparental disomy*”) (ZHANG *et al.*, 1993)(TANIGUCHI *et al.*, 1995)(SEGERS *et al.*, 2012). LOI é raramente encontrada em outros *loci*, demonstrando o papel específico desse mecanismo em TW (BJORNSSON *et al.*, 2007)(AL-HUSSAIN; ALI; AKHTAR, 2014). A epimutação em 11p15.5 foi detectada no sangue periférico de 33% (8 de 24) dos pacientes com TW (FIALA *et al.*, 2020), além de um estudo recente que descreveu a hipermetilação de *H19* como um evento embrionário *driver* precursor do TW (COORENS *et al.*, 2019). Essas alterações são geralmente associadas à histologia do tipo blastematoso ou epitelial, a restos nefrogênicos perilobares (GADD *et al.*, 2012), e ao início do desenvolvimento do tumor, o que torna tais alterações possíveis alvos terapêuticos (SATOH *et al.*, 2006) (SCOTT *et al.*, 2012)(MASCHIETTO *et al.*, 2014)(COORENS *et al.*, 2019).

Um estudo realizado pelo nosso grupo comparou o perfil de metilação global de LINE-1 (Elementos Nucleares Longos Intercalados; do inglês, *Long Interspersed Nuclear Element- 1*) em 47 amostras pareadas do componente blastematoso de TW e córtex renal normal adjacente, identificando um perfil de hipometilação global nas amostras tumorais. As análises uni- e multivariadas sugeriram que tanto o padrão de hipometilação de LINE-1 quanto a classificação de risco poderiam ser preditores de recaída após o tratamento quimioterápico desses pacientes (DE SÁ PEREIRA *et al.*, 2017). LINE-1 são elementos retrotransponíveis e correspondem a cerca de 17% do genoma humano, e, em condições normais, esses elementos estão metilados e silenciados no genoma. Sua ativação devido à perda de metilação ocorre em vários tipos de câncer e está associada à instabilidade genômica e pior prognóstico (KAZAZIAN; GOODIER, 2002)(BARCHITTA *et al.*, 2014)(HANCKS; KAZAZIAN, 2016)(ARDELJAN *et al.*, 2017).

A comparação de metilomas identificou três regiões diferencialmente metiladas (DMRs do inglês, *differentially methylated regions*) hipermetiladas em TW em relação

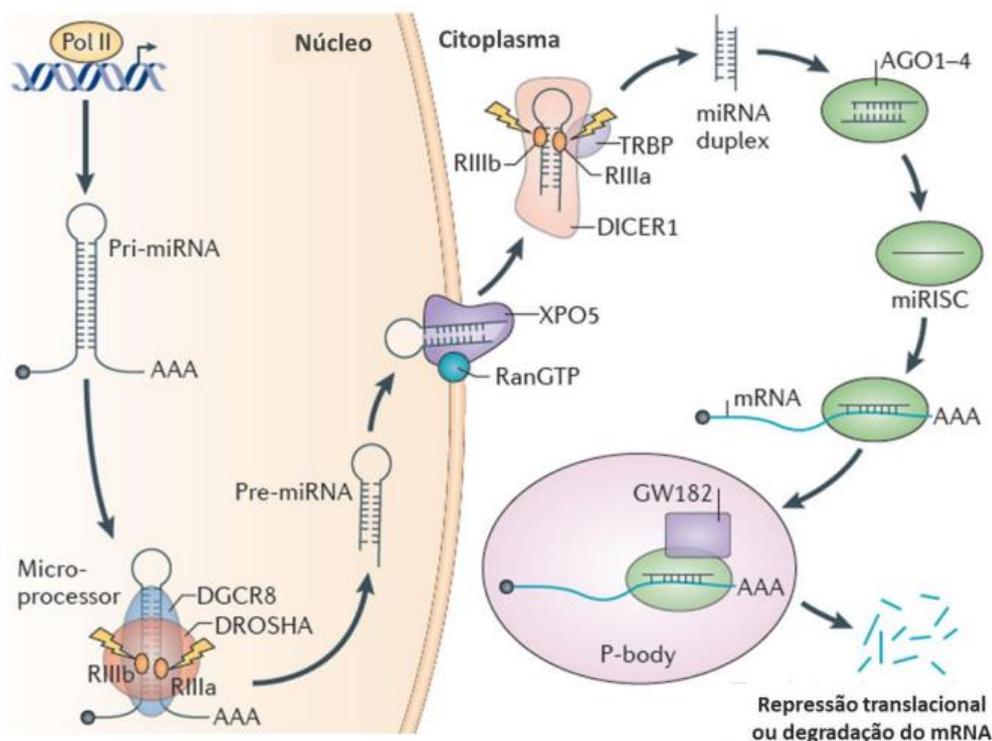
ao tecido renal normal adjacente, que poderiam ser usadas como biomarcadores tumor-específicos, uma vez que foram capazes de distinguir os tumores de tecidos normais com uma sensibilidade de 98% e revelaram uma diferença significativa nos níveis de metilação entre os TWs de risco intermediário e de alto risco. Dada a alta prevalência das DMRs (presentes em 112/120 TWs examinados), esses autores apresentaram um estudo piloto no qual uma dessas DMRs pôde ser detectada na circulação sanguínea de pacientes com TW, mostrando potencial para utilidade clínica em biópsia líquida (CHARLTON *et al.*, 2014). Também foram identificadas variações dos níveis de metilação durante o desenvolvimento tumoral, com padrões capazes de distinguir tecido normal, restos nefrogênicos (células precursoras dos TWs) e tecido tumoral. Isto seria especialmente importante em casos bilaterais, nos quais os restos nefrogênicos ocorrem em quase 100% dos casos, abrindo a possibilidade de identificar os restos nefrogênicos antes mesmo do desenvolvimento do tumor (CHARLTON *et al.*, 2015).

Apesar da evidente relevância que o mecanismo de metilação do DNA apresenta no TW, discute-se que talvez esse não seja o principal mecanismo iniciador tumoral e nem o único; mas pode ser útil na identificação de células que originam os diferentes subtipos tumorais, permitindo uma distinção entre eventos *drivers* e eventos que predisõem ao câncer (SAGHAFINIA *et al.*, 2018).

### **1.3.2.2. Alterações em miRNAs**

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes de cerca de 22 nucleotídeos (nt) envolvidos no silenciamento gênico pós-transcricional, controlando a tradução do RNA mensageiro (RNAm) em proteínas, e podem regular e ser regulados por outros mecanismos epigenéticos (LU *et al.*, 2005)(LOPEZ-SERRA; ESTELLER, 2012). Os miRNAs são fundamentais na fisiologia celular normal, no entanto, mudanças de expressão têm sido associadas a várias patologias, incluindo o câncer (KANWAL; GUPTA, 2012). Por isso, estudos têm utilizado perfis de expressão de miRNAs como fontes de informação sobre origem do tumor, fatores prognósticos ou preditores de risco (LU *et al.*, 2005). Mais de 60% dos genes humanos que codificam proteínas são regulados por miRNAs (FRIEDMAN *et al.*, 2008), que podem ser classificados como oncogênicos (ou oncomiRs), ou supressores de tumor, dependendo dos seus alvos e do tecido analisado (KASINSKI; SLACK, 2011). De forma simplificada, a biogênese

dos miRNAs pela via canônica ocorre de forma que os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II em pri-miRNAs, que são posteriormente clivados pelo microprocessador composto pela enzima DROSHA, juntamente com o seu cofator DGCR8 formando moléculas de cerca de 70 nucleotídeos - o microRNA precursor ou pré-miRNAs. O pré-miRNA é exportado para o citoplasma através do complexo XPO5 e RanGTP, sendo processado pela enzima DICER1 e seu cofator TRBP. Após esse processamento, a molécula dupla fita perde a estrutura em *loop* e é reconhecida pelo complexo de proteínas AGO. Ao perder uma das fitas, o miRNA é incorporado no complexo RISC para atuar na repressão da tradução ou na clivagem do RNAm, dependendo da complementariedade com o RNAm alvo (LIN; GREGORY, 2015) (Figura 1.4).



**Figura 1.4: Biogênese dos miRNAs pela via canônica.** Legenda: Pol II: RNA polimerase II; pri-miRNA: miRNAs primário; DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene-8; XPO5: exportina-5; AGO: argonauta; RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA (Fonte: Adaptado de LIN e GREGORY, 2015).

Um único miRNA pode ter como alvo múltiplos genes, e dessa forma, estar associado a uma variedade de vias relacionadas ao câncer. Além disso, essas moléculas apresentam papel regulatório tecido-específico importante, participam da regulação de genes relacionados à resistência à terapia, e podem levar a mudanças

de expressão de genes associados a processos fundamentais como proliferação celular e apoptose (SI *et al.*, 2019). Por isso, o perfil de expressão de miRNAs já foi correlacionado à quimiorresistência em diversos tipos de câncer, como mama, ovário, cólon, neuroblastoma, leucemias pediátricas, dentre outros (MA; DONG; JI, 2010) (CARVALHO DE OLIVEIRA *et al.*, 2018)(GALARDI *et al.*, 2018). Recentemente, nosso grupo publicou uma revisão na qual exploramos o papel de diversos miRNAs na biologia do TW e suas implicações clínicas e mecanismos de ação (de SÁ PEREIRA, *et al.*, 2021).

Conforme mencionado anteriormente, mutações em genes que participam da biogênese de miRNAs como *DROSHA*, *DGCR8*, *XPO5*, *DICER1*, *TARBP2* e *DIS3L2* ocorrem em frequências entre 14–33% em TWs, sendo *DROSHA* o gene mais frequentemente mutado, entre 10-14% dos casos de TW. A mutação de um alelo desencadeia processos que levam à menor expressão de um subconjunto de miRNAs, por afetar o processamento de miRNAs primários. A perda ou mutações somáticas em *DROSHA* prejudicam o desenvolvimento e função renal, no entanto, sozinhas, não são suficientes para a formação de TWs (MEI *et al.*, 2012)(KRUBER *et al.*, 2019). Mutações em *DROSHA* podem ocorrer concomitantemente com mutações em *SIX1/2*, associadas a restos nefrogênicos perilobares e a alterações de *imprinting* em 11p15, sendo esta co-ocorrência associada à ativação do gene *RAS* e a maiores índices de recaída e morte (RAKHEJA *et al.*, 2014b)(TORREZAN *et al.*, 2014) (WALZ *et al.*, 2015).

Alterações em *DICER1* foram descritas em cerca de 4% dos casos de TW (WALZ *et al.*, 2015). Ambas as mutações em *DROSHA* e *DICER1* alteram a expressão de miRNAs com função de supressores tumorais incluindo miRNAs da família let-7. Esta família regula *MYCN*, *LIN28* e outros oncogenes associados ao TW, além de afetar o processo de diferenciação epitelial (RAKHEJA *et al.*, 2014b). Mutações em *DGCR8* ocorrem entre 3-4% dos tumores. Alterações em *XPO5* e *TARBP2* são detectadas em frequências menores, afetando aproximadamente 1% dos casos (TORREZAN *et al.*, 2014)(WALZ *et al.*, 2015) (GADD *et al.*, 2017).

Mutações em *DIS3L2*, que atua na etapa final de processamento dos miRNAs, foram detectadas em alguns TWs, e associadas à maior predisposição ao desenvolvimento do tumor (ASTUTI *et al.*, 2012). Este gene está localizado em 2q37.1 e foi descrito que a perda dessa região ocorre em cerca de 4% dos TWs esporádicos.

### **1.3.3. Alterações de expressão gênica em TW**

A diferenciação celular é controlada pela expressão gênica, regulada tanto por estímulos internos quanto externos (RALSTON; SHAW, 2008). Assim, a transformação de uma célula normal em neoplásica advém também de mudanças no padrão de expressão de determinados genes (FISHMAN, 1976). Além de estarem envolvidos na tumorigênese, perfis diferentes de expressão podem ser detectados em diferentes fases do desenvolvimento tumoral, como por exemplo, durante sua progressão e o desenvolvimento de metástases (HARTUNG *et al.*, 2017).

Conforme mencionado anteriormente, o TW é caracterizado por apresentar histologia trifásica, sendo que os subtipos histológicos apresentam padrões de expressão gênica distintos, com diferentes níveis de similaridade a estágios iniciais da diferenciação renal. Células blastematosas apresentam um perfil de expressão mais similar ao de células renais embrionárias mais iniciais, sugerindo que essas células podem carregar as primeiras alterações moleculares que afetam a diferenciação renal e fornecem condições para o desenvolvimento do TW (MASCHIETTO *et al.*, 2008). Uma vez que o predomínio do componente blastematoso após quimioterapia é associado a um pior prognóstico e recidiva, estudos têm buscado avaliar alterações de expressão gênica nesse subtipo histológico com o intuito de identificar genes associados principalmente à progressão tumoral. Neste contexto, a super-expressão de *MCM2* em TW com predomínio de componente blastematoso foi associada ao maior risco de recidiva (MASCHIETTO *et al.*, 2011). Experimentos *in vivo* demonstraram que as células blastematosas do TW apresentaram alta expressão de *NCAM1* e *ALDH1* e características de auto renovação e diferenciação, típicos de células tronco tumorais (CSC, do inglês, *cancer stem cell*). Além disso, expressam, de forma similar a células renais primitivas, genes como *SIX2*, *OSR1*, *PAX2* e *SALL1*, o que levantou a hipótese de que as células do blastema seriam as CSC dos TWs (PODE-SHAKKED *et al.*, 2013)(SHUKRUN *et al.*, 2014)(MARKOVSKY *et al.*, 2017).

Apesar dos indícios de que a desregulação na expressão de determinados genes pode estar associada à progressão tumoral, ainda não há evidências concretas. Estudos que avaliam o perfil molecular de amostras de metástase de TW são raros, devido à dificuldade de se obter material para tais análises. A maior parte dos estudos busca identificar marcadores de recaída através da divisão das amostras de tumor primário de acordo com a ocorrência de recidiva da doença. Seguindo essa linha, um estudo identificou os genes *RARA* e *CRABP2* como potenciais biomarcadores de

progressão tumoral (PERCICOTE *et al.*, 2018). Além disso, diferenças de padrão de expressão já foram detectadas entre amostras tumorais de pacientes que apresentaram recaída e que não apresentaram, e entre tumores de risco intermediário e de alto risco. Dentre os genes identificados, *TRIM22*, *CENPF*, *MYCN*, *CTGF*, *RARRES3* e *EZH2* foram associados à progressão do TW (ZIRN *et al.*, 2006). A análise da expressão de um painel contendo 4.900 genes identificou o gene *CEBPB* super-expresso em amostras de pacientes que recidivaram, associado ao desenvolvimento e progressão do TW e um possível preditor de recaída (LI, WENLIANG *et al.*, 2005).

#### **1.3.4. Alterações de expressão proteica em TW**

De forma geral, assume-se implicitamente que alterações na expressão a nível de RNAm tenham significado biológico, provavelmente mediado por alterações correspondentes nos níveis de proteína. Suposição essa assumida pelo conhecimento do dogma central da biologia molecular, no qual a regulação da expressão gênica envolve a síntese de RNAm e proteína via transcrição e tradução, respectivamente (CRICK, 1970). Entretanto, há evidências de que a correlação entre a abundância de RNAm e os níveis de proteína correspondente é fraca, com vários fatores biológicos que influenciam essa correlação, além de restrições metodológicas (GRY *et al.*, 2009)(MCMANUS; CHENG; VOGEL, 2015).

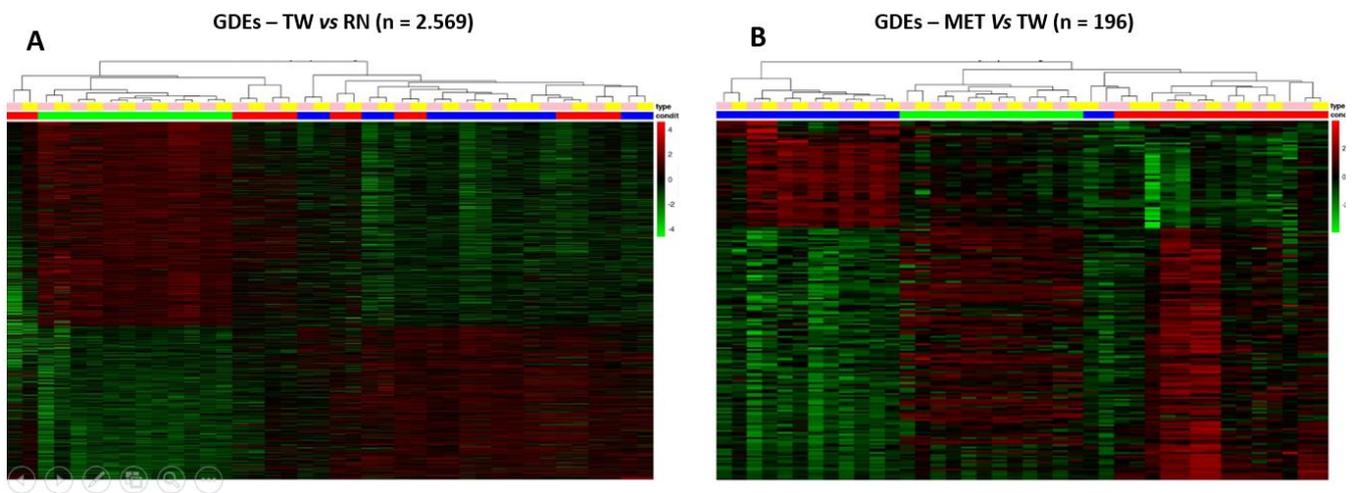
Estudos a nível proteico em TW são ainda escassos e pouco utilizados na prática clínica, sendo a heterogeneidade tumoral (tanto genética quanto histológica) um ponto crítico. A técnica de imunohistoquímica (IHQ) é predominantemente usada para diagnóstico diferencial dos TW, ainda que raramente (SEBIRE; VUJANIC, 2009). A WT1 (para todos os componentes histológicos); CK7 e pan-citoqueratinas (no componente epitelial); CD34 e BCL2 (componente estromal); INI1 e ciclina-D1 (componente indiferenciado) (OOMS *et al.*, 2020); e desmina e CD56 (componente blastematoso) (SEBIRE *et al.*, 2005)(ARNOLD *et al.*, 2014) são mais comumente usados, apesar de nenhum destes genes ser exclusivamente expresso no TW (MAGRO *et al.*, 2015).

Para fins de pesquisa, a expressão proteica de alguns alvos já foi avaliada, buscando correlacionar os níveis de expressão a desfechos clínicos, como recidiva e progressão tumoral, bem como estratificação de risco. Nesse sentido, imunexpressão aumentada de VEGFR1 foi associada à classificação de risco de

pacientes com TW (PERCICOTE *et al.*, 2013). CD56, CD57, CK22, CK18, CK8, EMA, SMA e actina foram propostos como marcadores úteis para diagnóstico, porém, com variabilidade entre os subtipos histológicos (VASEI *et al.*, 2008). Um aumento na intensidade de expressão de AE1/AE3 (uma pan-citoqueratina) no componente epitelial foi diretamente relacionado ao grau de maturação das estruturas epiteliais no tumor (SREDNI *et al.*, 2004). Superexpressão de Ciclina-A foi associada ao desenvolvimento e progressão dos TWs, bem como aos casos mais avançados da doença e com anaplasia focal e difusa (RADOJEVIĆ-ŠKODRIĆ *et al.*, 2019), e Ki67 foi proposto como um bom marcador prognóstico (KRISHNA *et al.*, 2016), assim como RGS4, P16 (LIU; GONG; ZHAO, 2017) e MCM2 (TARAN K *et al.*, 2011). Superexpressão de YY1 em TWs de histologia favorável foi descrito como um fator de risco para resultados adversos, associado ao componente blastematoso e ao desenvolvimento de metástase (ZAPATA-TARRES *et al.*, 2019). Imunoexpressão de PAX8 e PAX2 demonstraram ser úteis no diagnóstico diferencial do TW, porém com limitada especificidade (DAVIS *et al.*, 2011)(ARVA *et al.*, 2018). De forma geral, alterações a nível protéico ainda são pouco exploradas em TW principalmente pela dificuldade de se chegar a um consenso entre as diferenças de marcação e os desfechos avaliados. Isso se deve, em grande parte, à heterogeneidade intra e inter tumoral, o que gera uma grande inespecificidade nos padrões de expressão; e por isso, raros estudos encontraram associações significativas às características clínico-patológicas.

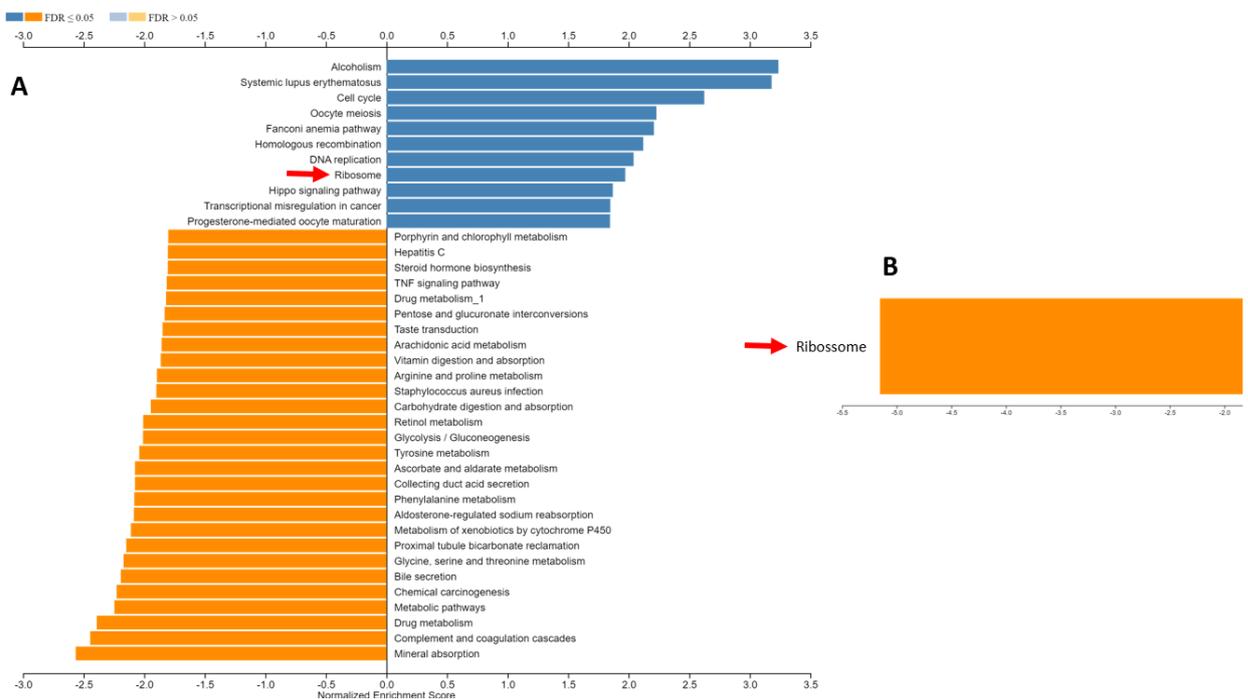
#### **1.4. DADOS PRÉVIOS – SELEÇÃO DOS ALVOS DO ESTUDO**

Entre os anos de 2017 e 2019, foi desenvolvida no Instituto Nacional de Câncer (INCA) a minha dissertação de mestrado, na qual avaliamos por meio da técnica de RNA-Seq, o transcriptoma de sete amostras pareadas (do mesmo paciente) de tecido renal normal (RN - córtex renal), tumor primário (TW – componente blastematoso) e metástase (MET - recidivas pulmonares). Os dados obtidos através do sequenciador *HiSeq2500* (Illumina, San Diego, Califórnia, EUA) foram processados pela pesquisadora (BMSP) em colaboração com o Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional (LBBC-INCA). Ao fim das etapas de processamento, foi realizada a análise de expressão diferencial entre as condições avaliadas (TW vs RN e MET vs TW) (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5: Genes diferencialmente expressos, identificados nas análises de RNA-Seq através das comparações entre as amostras. A. TW vs RN; B. MET vs TW. Legenda: amarelo = reads unpaired, rosa = reads paired, verde = RN, azul = TW, vermelho = MET.**

A partir das listas de genes diferencialmente expressos (GDEs), foram realizadas análises de enriquecimento de vias biológicas, através das quais a via ribossomal foi a única via identificada alterada em ambas as comparações (**Figura 1.6**).

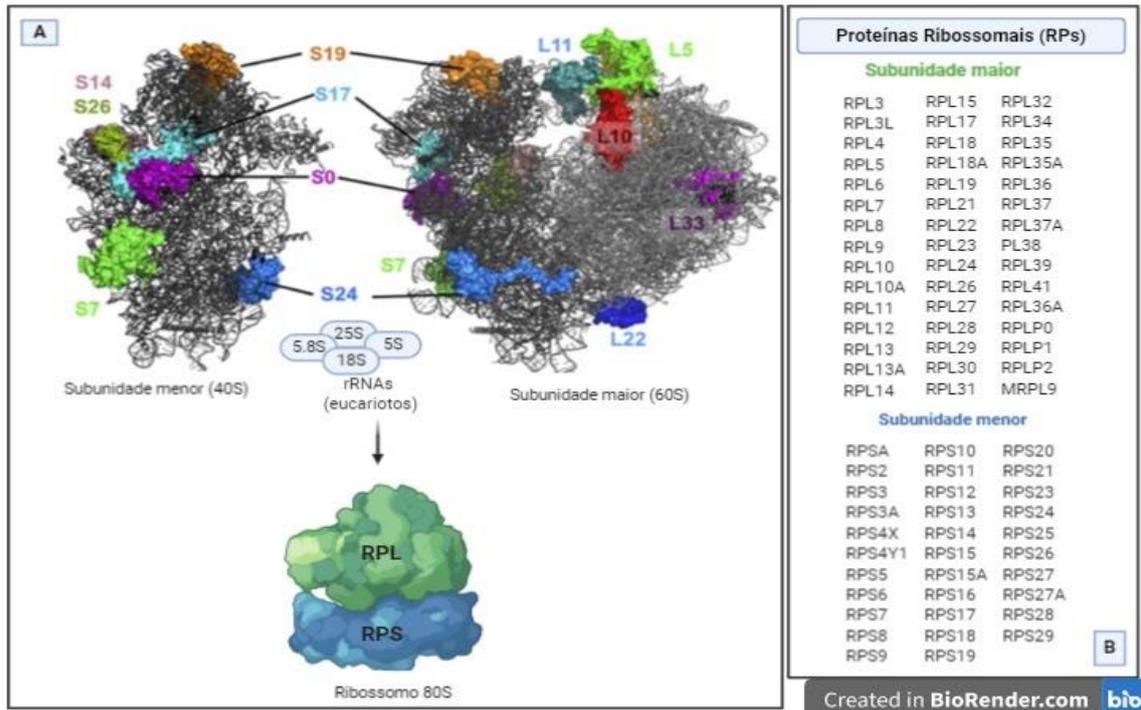


**Figura 1.6: Resultado do enriquecimento de vias gerado pelo banco de dados KEGG. A. vias enriquecidas baseadas nos GDEs entre a comparação TW vs RN; B. Via enriquecida baseada nos GDEs entre a comparação MET vs TW.**

Tanto a via quanto os genes associados foram usados em uma busca na literatura, com o intuito de identificar o papel destes no contexto do câncer em geral e do câncer pediátrico, resultando na seleção de *RPL5* e *RPL11* como alvos de investigação para o presente estudo. Assim propomos avaliar alterações moleculares de forma integrada, e seu papel no desenvolvimento e progressão de TW.

### **1.5. VIA RIBOSSOMAL - ASPECTOS FISIOLÓGICOS, FUNÇÕES EXTRA-RIBOSSOMAIS E MECANISMOS RELACIONADOS À DESREGULAÇÃO DA VIA**

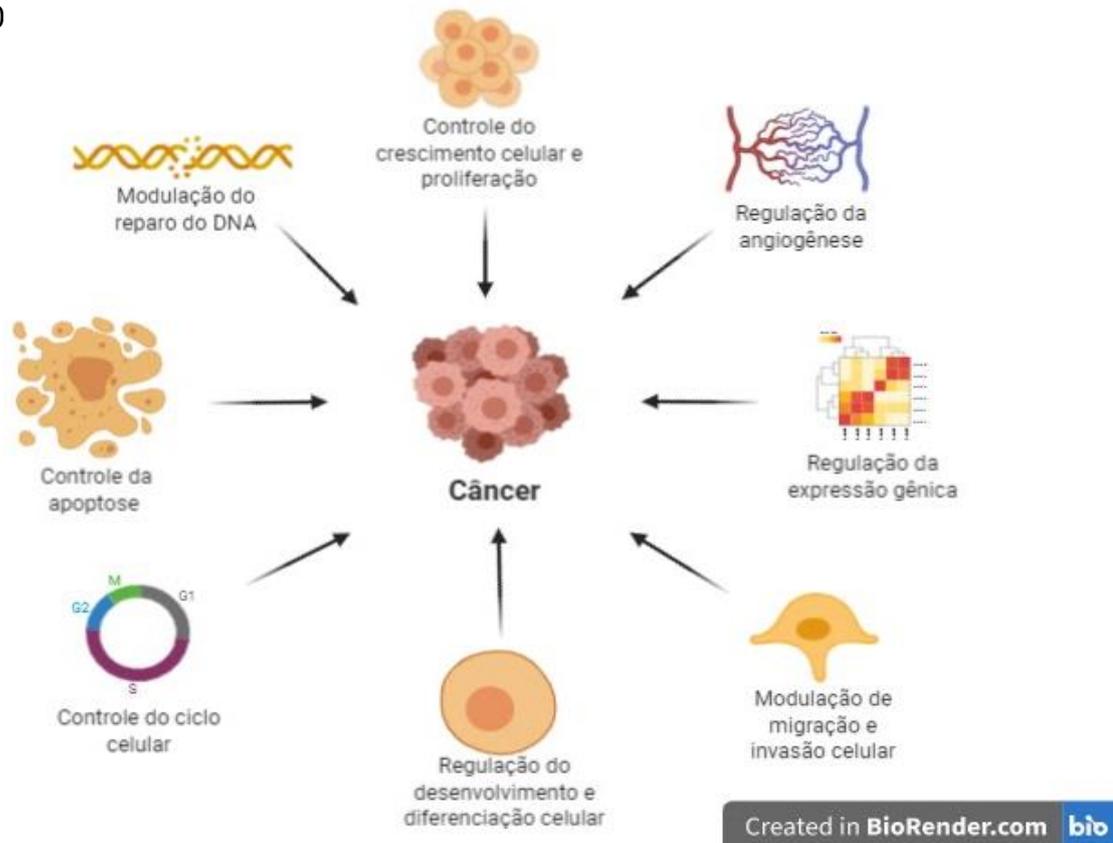
Os ribossomos são estruturas celulares formadas por RNA, compostos por duas subunidades. Em humanos, a subunidade menor (ou 40S) consiste em uma única cadeia de RNA ribossômico (rRNA) e 33 proteínas ribossomais (denominadas RPSs, do inglês *Ribosomal Proteins Small subunit*), enquanto a subunidade maior (ou 60S) consiste em três cadeias de rRNA e 47 proteínas ribossomais (denominadas RPLs, do inglês *Ribosomal Proteins Large subunit*). Essas duas subunidades formam o ribossomo maduro, também denominado 80S (KHATTER *et al.*, 2015)(ZHOU *et al.*, 2015) (**Figura 1.7**). Estas subunidades possuem papel crítico na fisiologia celular normal, nas respostas celulares a estímulos ambientais externos e na patogênese de doenças humanas, como o câncer (MYASNIKOV *et al.*, 2016)(XU, XILONG; XIONG; SUN, 2016)(GILLES *et al.*, 2020). A biogênese ribossomal é um processo finamente regulado e com alto consumo energético, e, portanto, tende a ocorrer em locais com alta disponibilidade de nutrientes e favoráveis à proliferação celular (LAFONTAINE; TOLLERVEY, 2001)(ZHOU *et al.*, 2015). Por outro lado, em uma situação conhecida como estresse ribossomal (ou estresse nucleolar), pode ocorrer a situação inversa, em que a atividade ribossomal e a síntese protéica são reduzidas, com subsequente parada do crescimento celular, devido à ativação da via p53, que leva à parada do ciclo celular e apoptose (LOHRUM *et al.*, 2003)(RUGGERO; PANDOLFI, 2003). Dessa forma, a biogênese ribossomal é um processo intimamente associado ao controle do crescimento celular e proliferação, e alterações nesse processo podem levar ao crescimento desordenado das células e conseqüentemente, em alguns casos, ao desenvolvimento de tumores (RUGGERO; PANDOLFI, 2003). Por isso, identificar mecanismos que estejam associados à desregulação do processo de biogênese ribossomal é de extrema importância para elucidar a conexão entre tais mecanismos e a patogênese tumoral.



**Figura 1.7 – Composição dos ribossomos e os genes que codificam as proteínas que compõem as subunidades maior e menor.** A. Os ribossomos são estruturas celulares responsáveis pela produção de proteínas. Em eucariotos, são formados pela subunidade maior (60S) composta pelas proteínas ribossomais RPL (do inglês *ribosomal proteins large subunit*), e pela subunidade menor (40S) composta pelas proteínas RPS (do inglês *Ribosomal Proteins Small subunit*). Essas subunidades, associadas aos RNAs ribossomais (rRNAs), dão origem aos ribossomos maduros denominados 80S. B. Os genes que codificam as proteínas ribossomais, também denominados RPs, constituem a via ribossomal, composta por cerca de 80 genes, descritos na tabela, os quais codificam as proteínas de mesmo nome (Adaptado de SULIMA *et al.*, 2014 e Wikipathway <https://www.wikipathways.org/index.php/Pathway:WP477>)

Os rRNAs são responsáveis pela maior parte das atividades enzimáticas, enquanto as proteínas ribossomais (RPs, do inglês *Ribosomal Proteins*) possuem papéis amplamente estruturais (LAFONTAINE; TOLLERVEY, 2001). Além de sua função básica na composição dos ribossomos, as RPs possuem uma série de papéis denominados “extra-ribossomais” (WARNER; MCINTOSH, 2009), que incluem o controle do crescimento celular e proliferação (VOLAREVIC, 2000)(KIM, JONG-HYUN *et al.*, 2004)(LINDSTRÖM; ZHANG, 2008)(WANZEL *et al.*, 2008), apoptose (KHANNA *et al.*, 2000)(HE; SUN, 2007)(ROSSI *et al.*, 2007), reparo do DNA (KIM *et al.*, 1995) (HEGDE; WANG; DEUTSCH, 2004)(KIM, TAE-SUNG; KIM; KIM, 2009), desenvolvimento celular (ANDERSON *et al.*, 2007)(DANILOVA; SAKAMOTO; LIN,

2008)(GAZDA *et al.*, 2008), diferenciação (DA COSTA *et al.*, 2003)(ZHAN *et al.*, 2010), dentre outros. Ainda, é descrito que algumas RPs podem sofrer modificações pós-traducionais (como ubiquitinação e fosforilação), o que pode conferir tais funções extra ribossomais a essas proteínas (WANG *et al.*, 2015) (**Figura 1.8**). Por fim, determinadas RPs atuam como “sentinelas” para identificar possíveis defeitos na biogênese ribossomal (WARNER; MCINTOSH, 2009)(ZHANG, YANPING; LU, 200

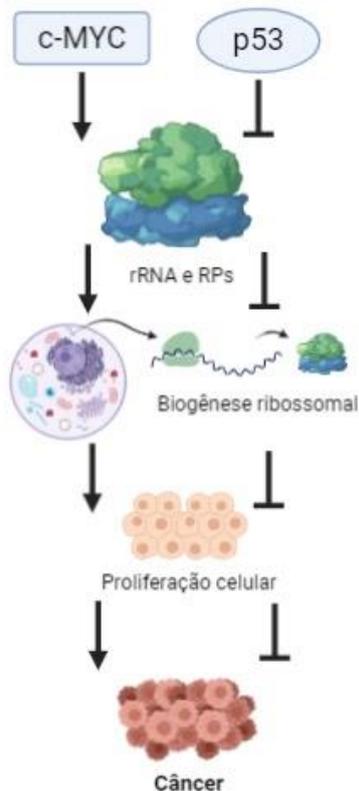


**Figura 1.8** - Algumas das funções extra-ribossomais conferidas às proteínas ribossomais (RPs), relacionadas ao câncer.

Diversos estudos demonstram que determinadas patologias humanas estão relacionadas a defeitos na biogênese ribossomal e/ou a alterações em genes que codificam as RPs, como no câncer. Em tumores renais, observou-se que algumas RPs se associam a subtipos moleculares relacionados às células de origem, o que poderia ser associado a possíveis alterações identificadas em TW. Isso porque esse tipo de tumor apresenta uma diversidade histológica que se associa a diferentes níveis de diferenciação (PANDA *et al.*, 2020). Evidências sugerem que os mecanismos relacionados às alterações na biogênese ribossomal podem incluir a via de sinalização

de p53; no entanto, tais processos são complexos e inúmeros fatores e mecanismos podem estar envolvidos; além de se observar que tais alterações são altamente tecido-específicas (GILKES; CHEN; CHEN, 2006)(SUNDQVIST *et al.*, 2009)(XUE; BARNA, 2012)(WANG *et al.*, 2015). Além disso, RNAs não codificantes como os miRNAs têm surgido como novos reguladores da biogênese ribossomal, apesar de ainda serem recentes os estudos nesse sentido (MCCOOL; BRYANT; BASERGA, 2020).

Tanto oncogenes quanto genes supressores tumorais podem regular a síntese de RPs, bem como o início da tradução dos ribossomos (RUGGERO; PANDOLFI, 2003)(ZHANG, YANPING; LU, 2009)(FREED *et al.*, 2010)(SHENOY *et al.*, 2012). Um dos genes mais bem descritos envolvido nessa regulação é o oncogene e fator de transcrição MYC (c-MYC), que modula a regulação de outros genes que participam do processo de montagem dos ribossomos (BOON *et al.*, 2001)(SHENOY *et al.*, 2012). Foi relatado que a super-expressão de c-MYC impulsiona a biossíntese de ribossomos e RPs em células tumorais, o que leva à tumorigênese (CHALLAGUNDLA *et al.*, 2011)(DANG, 2013). Por outro lado, é descrito que determinados genes que codificam RPs, como o *RPL11*, podem regular c-MYC através de um mecanismo de *feedback* negativo e, dessa forma, inibir sua atividade (DAI *et al.*, 2007)(DAI; SEARS; LU, 2007). Ainda, as proteínas RPs podem regular p53, que também atua como regulador da síntese de ribossomos, através da ligação de RPs específicas à proteína MDM2, bloqueando a ubiquitinação e degradação de p53 (LINDSTROM *et al.*, 2007)(KRUSE; GU, 2009) (**Figura 1.9**). Os principais genes da via ribossomal que atuam nesse mecanismo de regulação via MDM2-p53 descritas até o momento são *RPL5*, *RPL11*, *RPL23* (ZHANG *et al.*, 2003)(DAI *et al.*, 2004)(DAI; LU, 2004) e *RPS7* (CHEN *et al.*, 2007)(ZHU, YAN *et al.*, 2009), sendo proposto que principalmente *RPL5* e *RPL11* atuam de forma conjunta nessa regulação (HORN; VOUSDEN, 2008).



Created in BioRender.com 

**Figura 1.9** - Mecanismo de regulação da biogênese ribossomal e/ou de RPs específicas, por c-MYC e p53, relacionados a alterações de proliferação celular e ao desenvolvimento tumoral. (adaptado de WANG *et al.*, 2015).

Dessa forma, observa-se que alterações em RPs específicas, bem como em determinadas etapas da biogênese ribossomal, assim como o estresse nucleolar, são processos importantes relacionados à tumorigênese. No entanto, ainda são pouco explorados de forma geral no contexto do câncer, principalmente em tumores pediátricos.

### **1.6. *RPL5* E *RPL11* - PAPÉIS RELACIONADOS À REGULAÇÃO DA VIA RIBOSSOMAL E AO DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO TUMORAL.**

De acordo com a literatura, *RPL5* e *RPL11* têm sido descritos como genes-chave na regulação de diversos processos fisiológicos, assim como estão intimamente relacionados a algumas patologias, dentre as quais o câncer (HORN; VOUSDEN, 2008)(MILIANI DE MARVAL; ZHANG, 2011)(PELAVA; SCHNEIDER; WATKINS, 2016).

Apesar de o papel das RPs e da biogênese ribossomal na tumorigênese e progressão tumoral ainda ser indefinido, mutações em *RPL11* e *RPL5* já foram associadas a esses processos em alguns tipos de câncer. *RPL5* se destaca entre as RPs mais alteradas nos cânceres esporádicos, tanto em relação à frequência de mutações de perda de função quanto ao número de diferentes tipos de câncer nos quais essas mutações ocorrem (LAWRENCE *et al.*, 2014)(ORŠOLIĆ *et al.*, 2020). Um estudo publicado por KEERSMAECKER e colaboradores em 2012 identificou mutações em *RPL5*, *RPL11* e *RPL10* em 12 dos 122 casos (9,8%) de leucemia linfocítica aguda de células T (LLA-T) pediátricas (DE KEERSMAECKER *et al.*, 2013). Mutações de perda de função em *RPL5* foram descritas em glioblastoma (11%), melanoma (28%), câncer de mama (34%) e mieloma múltiplo (> 40%) (FANCELLO *et al.*, 2017). Mutações em *RPL5* e *RPL11* também são amplamente descritas nas denominadas ribossomopatias, como a DBA (anemia de Diamond Blackfan), que predis põem de forma exponencial ao risco de desenvolver tumores sólidos e hematológicos, como leucemia mielóide aguda (LMA), osteossarcoma e câncer de cólon (BORIA *et al.*, 2010)(VLACHOS *et al.*, 2012)(ARBIV *et al.*, 2018).

Alterações nos níveis de expressão gênica de RPs no câncer parecem ser comuns (WANG *et al.*, 2015)(ZHOU *et al.*, 2015), mas ainda não está claro se essas alterações são uma causa ou consequência da tumorigênese. Além disso, alterações nas RPs podem impactar a síntese proteica e, dessa forma, o nível de expressão de supressores tumorais chave pode ser diminuído de tal forma que leve à perda de função desse gene, deixando a célula suscetível a insultos internos e externos, culminando então, na transformação celular (WANG *et al.*, 2015). Um estudo realizado por AMSTERDAM e colaboradores utilizando o modelo *zebrafish* demonstrou que a biogênese ribossomal reduzida ou a perda de função dos genes que codificam as RPs podem ser correlacionadas com a transformação celular, enquanto a super-expressão desses genes pode impedir o crescimento do tumor (AMSTERDAM *et al.*, 2004). Em amostras humanas, a expressão de *RPL5* e outras RPs foram associadas à diminuição do risco de metástase tardia tanto em pacientes com câncer de mama não tratados adjuvamente quanto tratados com tamoxifeno, e à maior sobrevida em câncer de pulmão de células não pequenas (HELLWIG *et al.*, 2016). Considerando o perfil de expressão gênica, *RPL5* apresentou alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de tumores pediátricos teratóides/rabdóides atípicos. Além disso, foi

capaz de distinguir esses tumores de meduloblastomas, podendo ser útil no diagnóstico diferencial desses cânceres do sistema nervoso central (REN *et al.*, 2018).

Os mecanismos epigenéticos também têm sido associados às alterações na biogênese ribossomal e em RPs, e há um aumento cada vez maior de evidências sobre o papel dos miRNAs na regulação desses mecanismos. Uma revisão de literatura publicada por McCOOL e colaboradores sugeriu que os miRNAs e os RNAs longos sejam novos reguladores da biogênese ribossomal (MCCOOL; BRYANT; BASERGA, 2020). Foi demonstrado que *RPL5* e *RPL11* controlam a expressão de c-MYC através do recrutamento de miR-24 e do complexo RISC (do inglês, *RNA-induced silencing complex*) em resposta ao estresse ribossomal (CHALLAGUNDLA *et al.*, 2011)(LIAO *et al.*, 2014). No entanto, ainda há poucas evidências de como outros mecanismos epigenéticos também poderiam atuar nesse contexto, e explorá-los pode ser uma área para novos estudos.

O entendimento dos papéis biológicos das RPs poderia potencialmente estabelecer essas moléculas como uma nova classe de alvos terapêuticos pois, de forma geral, a biogênese ribossomal parece ser um alvo atrativo para o tratamento do câncer (KIM; LESLIE; ZHANG, 2014)(WANG *et al.*, 2015). Inúmeros estudos têm abordado a via RP-MDM2-p53 como alvo terapêutico em tumores pediátricos (KANG, MIN H. *et al.*, 2016)(KURMASHEVA; HOUGHTON, 2017)(TISATO *et al.*, 2017)(ZANJIRBAND; RAHGOZAR, 2019), como em neuroblastoma (BARBIERI *et al.*, 2013)(LAKOMA *et al.*, 2015)(AL-GHABKARI; NARENDRAN, 2019), glioblastoma (DANIELE *et al.*, 2015), meduloblastoma (HILL *et al.*, 2015), sarcoma (WONG *et al.*, 2014)(PHELPS *et al.*, 2015) e TW (GELLER; HOHENSTEIN, 2014).

Uma melhor compreensão das relações entre as disfunções das RPs e suas consequências é importante pois auxiliaria tanto a compreensão do desenvolvimento dos tumores como poderia fornecer opções para auxiliar no diagnóstico. Isso seria interessante especialmente em tumores pediátricos como o TW, nos quais ainda há uma escassez de estudos sobre a biologia tumoral e de novas vias de sinalização celular.

## **1.7. ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM TW**

Diferentemente das principais ômicas estudadas no contexto do câncer - como transcriptômica e genômica - a metabolômica foi introduzida no contexto científico mais tardiamente (OLIVER, 1998)(FIEHN, 2001). Atualmente, é uma metodologia já

bem estabelecida, que surgiu com foco principal na descoberta de novos biomarcadores em associação a outras metodologias, principalmente a genômica (TRIVEDI; HOLLYWOOD; GOODACRE, 2017).

Apesar de haver um crescente interesse pela área da metabolômica, ainda são escassos os estudos sobre como os metabólitos gerados durante o desenvolvimento do câncer podem contribuir para esse processo. Estudar esses mecanismos pode ajudar a entender melhor a relação entre as alterações nas vias metabólicas e a biologia tumoral, podendo ser úteis ainda para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e especialmente como biomarcadores, auxiliando o diagnóstico precoce, estadiamento da doença e acompanhamento de resposta ao tratamento (KELL, 2007)(ERB *et al.*, 2008)(SLUPSKY *et al.*, 2010)(WU *et al.*, 2010)(LIN, LIN *et al.*, 2011)(MONTEIRO *et al.*, 2013)(ARMITAGE; BARBAS, 2014). De forma geral, como se observa na literatura, os estudos nesse campo apenas descrevem um metaboloma muito limitado de determinadas doenças e não consideram as interações dessas moléculas com a fisiopatologia da doença (TRIVEDI; HOLLYWOOD; GOODACRE, 2017).

A metabolômica é o estudo do conjunto completo de metabólitos de baixo peso molecular (até 1.500 Da) presentes em biofluidos humanos, como sangue, urina, saliva, líquido cefalorraquidiano e tecidos (tumoriais ou não), possibilitando sua identificação e quantificação (LINDON; NICHOLSON; EVERETT, 1999)(FANOS *et al.*, 2011). Esse perfil de metabólitos é definido não somente por alterações a nível genômico e compostos endógenos, mas também por compostos exógenos, derivados do meio ambiente, por influência de alimentos, medicamentos e outras substâncias consumidas pelo indivíduo (WISHART *et al.*, 2012). Dessa forma, o perfil metabolômico pode ser considerado como o panorama final de resposta de um determinado organismo a todos esses fatores, determinando conseqüentemente, o fenótipo observado (KLUPCZYŃSKA; DEREZIŃSKI; KOKOT, 2015). Por essa característica, uma das principais aplicações do estudo da metabolômica tem sido explorá-la como uma ferramenta para biópsias líquidas, considerando o perfil dos metabólitos em relação à doença de uma forma específica (CLAUDINO *et al.*, 2007)(SPIGA *et al.*, 2013). De forma geral, estudos sobre biomarcadores raramente saem do campo de pesquisa básica para se integrarem à prática clínica, fato que se dá, em parte, devido à falta de validação dos dados obtidos associado ao pequeno número de amostras que geralmente é avaliado, principalmente em tumores raros

como o TW. Portanto, integrar dados de diferentes metodologias é uma etapa de extrema importância para validar a qualidade dos dados gerados e levá-los futuramente à aplicação clínica (MOCO *et al.*, 2013)(TRIVEDI; HOLLYWOOD; GOODACRE, 2017).

Corroborando o crescente interesse pela relação entre metabolismo e câncer, no ano de 2016, PAVLOVA e THOMPSON publicaram um trabalho no qual descrevem os *hallmarks* emergentes do metabolismo do câncer (PAVLOVA; THOMPSON, 2016); e em 2020 WEI e colaboradores publicaram uma revisão sobre o papel do metabolismo no desenvolvimento de metástases, descrevendo ainda possíveis implicações terapêuticas dessas moléculas (WEI, QINYAO *et al.*, 2020).

Apesar de ser descrita como uma técnica com grande potencial a ser explorado, em tumores pediátricos, são raros os estudos que abordam o papel dos metabólitos nesse contexto (SPIGA *et al.*, 2013), e dados da literatura apontam que, atualmente, há cerca de 20-30 compostos que podem estar associados ao desenvolvimento de tumores pediátricos e também à metástase (QUINTERO ESCOBAR *et al.*, 2019).

São descritos alguns estudos que avaliaram alterações metabólicas específicas em tumores pediátricos, como em amostras tumorais de neuroblastoma, em que diferentes metabólitos foram correlacionados ao estadiamento e ao prognóstico da doença. Além disso, os ácidos homovanílico e vanilmandélico, metabólitos derivados da dopamina e norepinefrina, respectivamente, detectados na urina, são comumente utilizados para o diagnóstico e monitoramento de pacientes com esse tipo de tumor (TZIKA *et al.*, 2002) (MONSAINGEON *et al.*, 2003) (RILEY *et al.*, 2004)(CANGEMI *et al.*, 2013). Um estudo publicado por ANSELMINI e colaboradores destacou que as alterações metabólicas podem ter impacto direto em vias de sinalização importantes associadas à fisiopatologia de tumores, o que tem sido explorado em tumores de adultos, mas que ainda é um campo a ser explorado na oncologia pediátrica (ANSELMINI *et al.*, 2020).

Em TW, poucos estudos são encontrados com informações sobre alterações metabólicas relacionadas à tumorigênese e características clínico-patológicas. Estudos sobre o metabolismo energético mitocondrial de TWs demonstrou perfis diferentes quando avaliados os subtipos histológicos, sendo que blastema e epitélio apresentam metabolismo normal, enquanto o estroma possui níveis diminuídos desse metabolismo em relação ao tecido adjacente normal (KOFLENER, 2011). Além de

corroborar esses dados, um outro estudo identificou diminuições nos níveis de aldeído desidrogenase e em proteínas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa e de aminoácidos nas amostras tumorais (tratadas com quimioterapia prévia à cirurgia) em relação ao tecido normal. Este estudo hipotetiza que muitas das diferenças a nível metabólico global entre os tecidos normais e tumorais, bem como naqueles pertencentes a vias metabólicas específicas, como da cadeia de transporte de elétrons e do metabolismo de ácidos graxos e glicólise, são provavelmente uma consequência do tratamento quimioterápico (HAMMER *et al.*, 2014). Isso porque a vincristina (utilizada no tratamento do TW) é descrita por bloquear a mitose de maneira dose-dependente, induzindo a apoptose/necrose em células tumorais (GIDDING, 1999). Nesse sentido, é necessário ainda considerar o protocolo de tratamento ao qual os pacientes do estudo serão submetidos para uma correta interpretação dos dados. Os metabólitos na urina de controles normais e portadores de TW de diferentes estágios e histologias foram comparados, demonstrando que os níveis de creatina, creatinina, acetato e citrato foram diminuídos nos pacientes com TW em comparação com os controles. Em contrapartida, níveis elevados de aminoácidos, açúcares e outros metabólitos específicos como a dimetilamina foram identificados nos pacientes em relação aos controles, sugerindo que o perfil metabólico pode ser útil na distinção entre controles, diferentes estágios de TW, histologia e recidiva (MACLELLAN *et al.*, 2014).

## **2. CAPÍTULO 1: Avaliação de alterações moleculares em *RPL5* e *RPL11* e seu papel no desenvolvimento e progressão de tumores de Wilms.**

### **2.1. JUSTIFICATIVA**

A baixa frequência relativa de alterações genéticas (mutações ou alterações de número de cópias de regiões cromossômicas) em tumores pediátricos sugerem que alterações epigenéticas, como metilação do DNA e de RNAs não codificantes podem estar associadas à sua tumorigênese. Desta forma, há um interesse cada vez maior em explorar as alterações epigenéticas nos tumores pediátricos.

Ao longo dos anos, novas vias de sinalização e mecanismos são associados a diversos tipos de tumores, sendo também importante entender de que forma podem estar associadas à desregulação de genes relacionados. Nesse contexto, torna-se relevante avaliar possíveis alterações moleculares, de forma integrada, que possam estar relacionadas à alteração de genes-alvo específicos, e, conseqüentemente, às vias biológicas nas quais esses genes estão envolvidos.

Dados os escassos estudos acerca do papel de *RPL5* e *RPL11* em TW, associado a resultados prévios obtidos pelo grupo, propomos avaliar os mecanismos moleculares que possam estar associados a alterações nesses genes e, conseqüentemente, às vias e processos relacionados.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar alterações moleculares em *RPL5* e *RPL11* e seu papel em tumores de Wilms.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- A.** Avaliar o perfil mutacional de *RPL5* e *RPL11*;
- B.** Avaliar os níveis de expressão gênica e proteica de *RPL5* e *RPL11* em TW;
- C.** Avaliar o perfil de metilação dos genes *RPL5* e *RPL11*;
- D.** Avaliar a expressão de miRNAs selecionados que têm *RPL5* e *RPL11* como alvos em TW;
- E.** Correlacionar os níveis de expressão gênica e proteica com o perfil de metilação, de expressão de miRNAs e perfil mutacional de *RPL5* e *RPL11*;
- F.** Associar os achados moleculares com as características clínicas e os desfechos dos pacientes.

## **4. CASUÍSTICA E METODOLOGIA**

### **4.1. COMITÊ DE ÉTICA**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (CEP-INCA) sob registro CAAE 09981018.3.0000.5274 (**ANEXO 1**).

### **4.2. CASUÍSTICA**

#### ***4.2.1. Critérios de inclusão e exclusão***

As amostras de tecido renal normal (córTEX) adjacente ao tumor (RN) e tumor primário (TW) são provenientes de crianças com diagnóstico anatomopatológico confirmado de TW, e tratadas de acordo com o protocolo RSGT-SIOP-2001 na divisão de Pediatria do INCA e que realizaram cirurgia entre os anos de 2007-2019.

➤ Foram incluídos:

- Todos os casos diagnosticados como TW entre os anos de 2007-2019 e doadores do Banco Nacional de Tumores do INCA (BNT-INCA);

➤ Foram excluídos:

- Pacientes com tumores bilaterais (estadiamento V);
- Pacientes com síndromes congênitas;
- Pacientes com idade superior a 14 anos no momento do diagnóstico;
- Pacientes com tempo de seguimento terapêutico (*follow-up*) menor que 2 anos;
- Pacientes que não seguiram o protocolo RSGT-SIOP-2001;
- Casos sem tecido de interesse disponível para análises moleculares (amostras não coletadas no momento da cirurgia, amostras com necrose, fibrose, hemorragia, etc);
- Amostras de RN que não fossem provenientes do córtex renal;
- Pacientes tratados fora do INCA e/ou sem dados clínico-patológicos disponíveis.

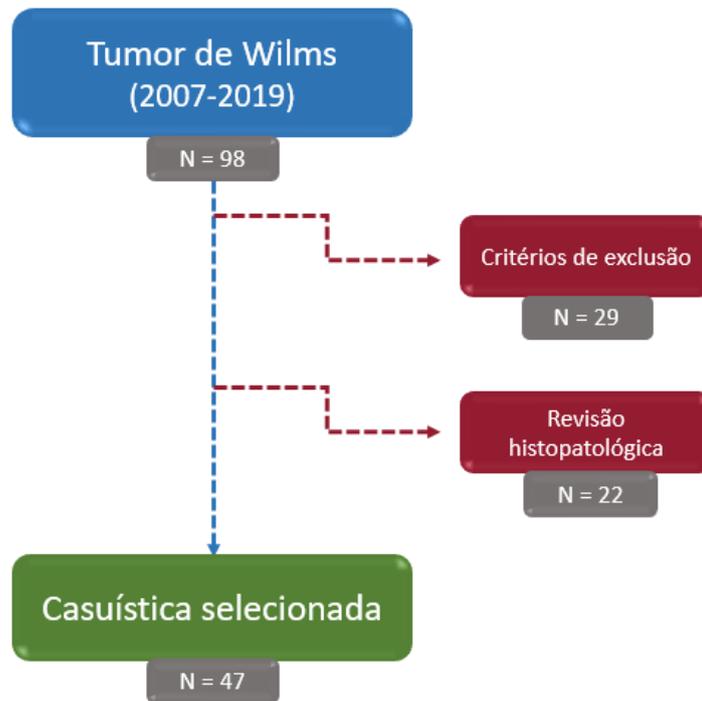
#### ***4.2.2. Variáveis avaliadas***

Foi feito um levantamento dos dados clínicos e patológicos disponíveis no sistema eletrônico do INCA referentes aos prontuários de cada caso, sendo as seguintes variáveis avaliadas:

- Data do diagnóstico;
- Histologia predominante na peça tumoral;
- Classificação histológica RSTG-SIOP-2001 (DOME; PERLMAN; GRAF, 2014a);
- Estadiamento (clínico e patológico) (DOME; PERLMAN; GRAF, 2014a);
- Presença de anaplasia (focal ou difusa);
- Data da nefrectomia;
- Recaída à distância (metástase distante);
- Local anatômico e data da recaída;
- Data da última consulta ou data do óbito (*follow up*);
- Drogas utilizadas durante o tratamento (primário e recidiva).

#### **4.2.3. Seleção das amostras**

Inicialmente, foi feito um levantamento de todos os casos diagnosticados e tratados na divisão de Pediatria do INCA, que passaram por cirurgia (nefrectomia) e tinham amostras cadastradas no BNT-INCA. Foram identificados 98 casos, entre os anos de 2007 e 2019. Foram excluídos 29 casos após aplicarmos os critérios de exclusão. Foi solicitado ao BNT-INCA as lâminas-espelho de hematoxilina-eosina (HE) correspondentes ao material armazenado dos 69 casos remanescentes (tecidos normal e tumoral), e essas lâminas foram revisadas por um único patologista (Dr. Paulo A. Faria) acompanhados pela pesquisadora (BMSP), confirmando a histologia do tecido tumoral e a presença de córtex renal no tecido normal. Durante a revisão, foram excluídos outros 22 casos devido à falta de tecido tumoral viável (presença de fibrose, necrose, etc.), não haver tecido tumoral disponível no BNT-INCA e/ou por não seguirem o protocolo RSTG-SIOP-2001, restando ao final 47 casos que foram divididos entre as análises moleculares subsequentes. A estratégia de seleção do estudo está descrita na **figura 4.1**.



**Figura 4.1** - Estratégia de seleção dos casos incluídos no estudo. Casos excluídos em vermelho, casos incluídos ao final da seleção em verde.

É importante destacar que, para as metodologias de validação descritas neste estudo, as amostras selecionadas não tiveram componente histológico específico isolado, e que os tumores de Wilms apresentam, de uma forma geral, histologia trifásica, composto por blastema, epitélio e estroma.

### 4.3. METODOLOGIA

#### 4.3.1. Revisão anatomopatológica dos casos.

Durante a revisão das lâminas e dos prontuários, foi preenchida uma ficha com as seguintes características:

- Identificação do paciente (iniciais, número de matrícula, data de nascimento e diagnóstico, etc);
- Lateralidade do tumor, peso e dimensões;
- Blocos (amostras fixadas em blocos de parafina e armazenadas na Divisão de Patologia do INCA (DIPAT-INCA) e lâminas correspondentes à nefrectomia e metástase disponíveis;

- Amostras congeladas (armazenadas no BNT-INCA) e lâminas correspondentes à nefrectomia disponíveis;
- Histologia predominante (nefrectomia e metástase);
- Presença de anaplasia (focal ou difusa);
- Presença de restos nefrogênicos (intralobar ou perilobar);
- Presença de metástase regional e/ou distante (ao diagnóstico ou recidiva);
- Demais observações do patologista responsável e/ou pesquisadora.

### **4.3.2. Análises *in silico***

#### **4.3.2.1. Dados publicados e depositados em bancos de dados**

Para avaliar se os achados iniciais relacionados a frequência de mutações e expressão de miRNAs são exclusivos do nosso grupo de amostras ou se são comuns à doença, foram utilizados dois estudos: dados depositados no banco de dados *cBioPortal* ([https://www.cbioportal.org/study/summary?id=wt\\_target\\_2018\\_pub](https://www.cbioportal.org/study/summary?id=wt_target_2018_pub)) gerados de pacientes tratados pelo COG (GADD *et al.*, 2017) e dados depositados no banco de dados GEO (*Gene Expression Omnibus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)) (LUDWIG *et al.*, 2016 - GSE57370) que utiliza amostras de pacientes tratados pelo protocolo SIOP. Os testes estatísticos foram realizados no *software GraphPad Prism 5*.

#### **4.3.2.2. Sequenciamento de nova geração para expressão gênica - dados prévios do grupo**

Dados de transcriptoma obtidos por RNA-Seq, gerados durante o mestrado da pesquisadora (BMSP), foram utilizados como ponto de partida para a seleção dos genes avaliados no presente estudo. Foram avaliados sete casos pareados de tecido renal normal (córtex) adjacente ao tumor (RN), tumor primário (TW, especificamente o componente blastematoso) e metástases pulmonares (MET - recidivas da doença). As amostras foram provenientes da DIPAT-INCA, em blocos de parafina (FFPE, do inglês *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*). Após revisão patológica realizada pelo Dr. Paulo A. Faria acompanhada pela pesquisadora, foi selecionado um bloco correspondente a cada área de interesse: RN (córtex), TW (blastema) e MET (biópsias pulmonares), sendo os três blocos correspondentes ao mesmo paciente.

Resumidamente, após a seleção dos casos, foi confeccionada uma lâmina espelho em HE, na qual foi feita a marcação das áreas de interesse específicas. Nos blocos FFPE correspondentes, foram feitos 10 cortes transversais de 5 µm de espessura com micrótomo automatizado (LEICA RM2255). Cada corte foi fixado em uma lâmina histológica, e cada lâmina espelho correspondente foi utilizada como padrão para os cortes das áreas específicas marcadas. Foi feita uma raspagem das lâminas com os cortes FFPE fixados, apenas nas áreas demarcadas. A partir desse material macrodissecado, foi feita a extração de RNA utilizando o kit *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A avaliação da pureza e quantificação do RNA extraído foi feita através de espectrofotometria por NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e a integridade do material foi avaliada pela técnica de transcrição reversa seguido de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-PCRq, do inglês *reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction*), com base na amplificação do gene constitutivo *GAPDH* (114 nt), em *Rotor-Gene Q* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e com o reagente intercalante da dupla fita de DNA *QuantiFast SYBR Green PCR Kit* (Qiagen). Posteriormente, as amostras que passaram por esse controle de qualidade foram submetidas ao preparo das bibliotecas de cDNA utilizando o kit *TruSeq RNA Access Library Prep* (Illumina), para bibliotecas *paired-end*, seguindo as instruções do fabricante. As bibliotecas foram quantificadas utilizando o kit comercial *NEBNext Library Quant Kit for Illumina* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EUA) através de uma reação de PCRq em termociclador *Eco Real Time PCR System* (Illumina) além de uma quantificação paralela adicional feita por fluorimetria com o kit *Qubit dsDNA Broad-Range Assay Kits* (Life Technologies). A partir dessas quantificações, foram feitos os cálculos para determinar a concentração final de cada amostra para o sequenciamento, de 2 nM. O sequenciamento foi realizado no sequenciador *HiSeq2500* (Illumina), e foram sequenciadas 21 amostras, correspondentes aos sete casos pareados selecionados.

Os dados provenientes do sequenciamento foram processados pela pesquisadora em colaboração com a pesquisadora Dra. Mariana Boroni, do LBBC-INCA. Resumidamente, os arquivos contendo os dados gerados pelo sequenciador (dados brutos) no formato fastq foram submetidos a um controle de qualidade pelo *software* FastQC v.0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), o corte dos *reads*

gerados foi feito utilizando o pacote Trimmomatic v0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014), a retirada da cauda poli-A foi feita pelo pacote Prinseq lite-0.20.4 (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011), o alinhamento dos *reads* ao genoma de referência (versão 38 do Genoma Humano, GRCh38) foi realizado utilizando o pacote STAR v2.5.3a (DOBIN; GINGERAS, 2015) e, por fim, a contagem dos *reads* alinhados aos genes correspondentes do genoma de referência foi feita através do pacote HTSeq (ANDERS; PYL; HUBER, 2015).

A partir das matrizes de contagem geradas, foram realizadas as análises de expressão diferencial, utilizando o pacote DESeq2 v.1.18.1 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). A normalização dos dados foi feita com base no método de mediana de razões, que leva em consideração a profundidade do sequenciamento para cada amostra (tamanho da biblioteca). Após a normalização, o teste de Wald foi aplicado para cada gene para determinar se a diferença encontrada entre os grupos é significativa, assim como o método para correção de múltiplas hipóteses de Benjamini-Hochberg (BH) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) que calcula para cada gene um valor de p ajustado (adjP) baseado na taxa de falsas descobertas (FDR, do inglês, *False Discovery Rate*). As análises foram feitas em ambiente R versão 3.4.1, utilizando a interface RStudio versão 1.0.153. Os critérios considerados para significância estatística dos GDEs foram *lfcThreshold* > 0.1; adjP < 0.001. Foram realizadas comparações entre os grupos TW vs RN e MET vs TW.

As análises de enriquecimento de vias biológicas dos GDEs foram realizadas através do software WebGestalt R (*WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit* - <http://www.webgestalt.org/>) (ZHANG; KIROV; SNODDY, 2005) utilizando o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KANEHISA, 2000), pelo método de análise de enriquecimento de conjuntos de genes (GSEA, do inglês *Gene Set Enrichment Analysis*), sendo considerados vias enriquecidas aquelas com adjP < 0,05 (SUBRAMANIAN *et al.*, 2005) , através do método de BH, usando o genoma humano como referência.

#### **4.3.2.3. Sequenciamento de nova geração para avaliação de mutações - dados prévios do grupo**

Os dados provenientes do sequenciamento de RNA-Seq das amostras de RN, TW e MET foram avaliados para a presença de mutações e pequenas inserções em *RPL5* e *RPL11*, que pudessem estar associadas às diferenças de expressão

observadas. Esta etapa foi realizada em colaboração com o aluno de doutorado, Marco Antonio Pretti, no LBBC-INCA. Essa análise foi feita conforme as boas práticas do pacote GATK4 (AUWERA *et al.*, 2013)(HELDENBRAND *et al.*, 2019). Os *reads* de cada amostra foram alinhados ao genoma de referência (versão 38 do Genoma Humano, GRCh38) utilizando o pacote STAR-2-PASS v2.6 (DOBIN; GINGERAS, 2015), as leituras duplicadas foram marcadas utilizando o pacote Picard v2.18.5 (<https://broadinstitute.github.io/picard/>) e a qualidade das bases foi recalibrada através do GATK4. Variantes de base única e pequenas inserções e deleções foram identificadas utilizando o Varscan2 (KOBOLDT *et al.*, 2009) utilizando os parâmetros *default* do programa e uma cobertura mínima de sete leituras para cada amostra. O parâmetro 'processSomatic' do Varscan2 foi utilizado para selecionar variantes de alta qualidade.

#### **4.3.2.4. Microarranjo de metilação - dados prévios do grupo**

Foram utilizados os resultados gerados pelo aluno de iniciação científica João Victor da Silva Guerra, sob orientação da pesquisadora Dra. Mariana Maschietto no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) em Campinas (SP). Foram selecionados sete casos com amostras pareadas de RN, TW primário e metástases pulmonares (recidivas), sendo que cinco destes casos também foram avaliados pelo RNA-Seq. As amostras selecionadas tiveram seu DNA extraído com o kit *QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, o DNA foi tratado com bissulfito de sódio utilizando o kit *EZ DNA Methylation Kit* (Zymo Research, Irvine, California).

Este projeto avaliou cerca de 450 mil sítios de metilação (denominados sítios CpG) usando a plataforma *Infinum HumanMethylation 450K Beadchip arrays* (Illumina), nos sete casos pareados de RN, TW (componente blastematoso) e MET (biópsias pulmonares), sendo cada trio correspondente ao mesmo paciente. Esta análise foi realizada com o intuito de avaliar o perfil de metilação das Regiões Diferencialmente Metiladas (DMRs) e Posições Diferencialmente Metiladas (DMPs), com o objetivo de identificar regiões e/ou posições com padrão de metilação alterado, que possam ser associados ao desenvolvimento e à progressão tumoral de TW. Resumidamente, foram avaliados os trios de amostras de RN, TW e MET considerando as variações inter e intra-pacientes para identificar as DMPs utilizando o pacote minfi (RITCHIE *et al.*, 2015). Foram considerados significativos os CpGs com

uma diferença média absoluta de metilação ( $|\Delta\beta|$ ) maior que 10% e  $\text{adj}P < 0,01$ . As DMRs foram identificadas utilizando o pacote DMRcate (PETERS *et al.*, 2015) tendo como parâmetro, sequências de 300 pares de bases contendo pelo menos sete sítios CpGs consecutivos mostrando o mesmo padrão de metilação. Foram consideradas estatisticamente significativas as DMRs com  $\text{adj}P < 0,05$  e  $|\Delta\beta|$  maior que 10%.

#### **4.3.2.5. Microarranjo de expressão de miRNAs - dados prévios do grupo**

Foram utilizados os resultados gerados durante o doutorado da aluna Rafaela Montalvão de Azevedo, concluído em março de 2018 no INCA sob orientação da pesquisadora Dra. Beatriz de Camargo.

Para realizar o microarranjo, foram selecionados 20 casos de TW primário (FFPE), com predomínio do componente blastematoso, dos quais foi selecionado e macrodissecado especificamente este componente. Desses 20 casos, foi avaliado também o tecido normal (RN, córtex) de cinco pacientes. Para extração do RNA total, foi usado o kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. A avaliação da integridade e qualidade do RNA extraído foi feita pela técnica de RT-PCRq, com base na amplificação do gene constitutivo *GAPDH* (114 nt), em *Rotor-Gene Q* (Qiagen) e com o reagente intercalante da dupla fita de DNA *SYBR GoTaq® qPCR Master Mix* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA).

As amostras que passaram pelo controle de qualidade foram hibridizadas nos *chips* de microarranjo *miRNA 4.0 Array* (Affymetrix - Thermo Fisher Scientific, Santa Clara, Califórnia, EUA), segundo o protocolo *FlashTag™ Biotin HSR Labeling Kit* (Affymetrix). O *Genechip® miRNA 4.0 Array* (Affymetrix) contém sondas desenhadas para avaliar a expressão de pequenos RNAs não codificantes (sncRNAs, do inglês *small non coding RNAs*) contidos no banco de dados miRBase versão 20, cobrindo 30.424 sequências de seis organismos, dos quais 6.597 são de humanos, incluindo 2.578 miRNAs maduros. Os *chips* foram lidos em *scanner GeneArray® Scanner 7G* (Affymetrix), segundo as instruções do fabricante. Após a captura das imagens, a análise inicial das hibridações foi feita utilizando o *software Expression Console* (Affymetrix), e os arquivos gerados em formato *\*.cel*. Os dados foram normalizados através do método RMA (do inglês, *Robust Multiarray Average*) (IRIZARRY, 2003)

utilizando  $p < 0,05$  como critério de expressão diferencial determinada por uma abordagem bayesiana empírica. A análise dos dados de expressão global foi realizada em ambiente R usando o pacote limma (do inglês, *Linear Models for Microarray*) (RITCHIE *et al.*, 2015). MiRNAs com valor de  $p < 0,05$  foram considerados diferencialmente expressos entre os grupos.

#### **4.3.3. Coleta e armazenamento das amostras**

As amostras provenientes do BNT-INCA foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de RNA e/ou proteínas.

#### **4.3.4. Extração de RNA**

A extração de RNA foi realizada utilizando o kit comercial *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras congeladas foram fragmentadas com o auxílio de um bisturi e maceradas com o auxílio de um pistão para facilitar a digestão do tecido durante a extração, sendo mantidas em gelo seco durante todo o processo. Foram adicionados a cada amostra 100 ou 200  $\mu\text{L}$  (a depender da quantidade de tecido) de tampão de digestão juntamente com 4  $\mu\text{L}$  de protease, homogeneizando-as levemente. As amostras foram então incubadas a  $50^{\circ}\text{C}$  por 30 min em termobloco e, em seguida, a  $80^{\circ}\text{C}$  por 15 min, para completa digestão da amostra. Posteriormente, foram adicionados 120 ou 240  $\mu\text{L}$  do Aditivo de Isolamento e 275 ou 550  $\mu\text{L}$  de etanol 100%, homogeneizando-se por pipetagem. O sobrenadante foi transferido dos tubos para as colunas de purificação acopladas aos tubos coletores de 2 mL, e centrifugados a 10.000 rpm por 30 segundos, e o líquido filtrado no tubo coletor foi descartado após a centrifugação. Em seguida, foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  do Tampão de Lavagem 1 na coluna de purificação e os tubos foram centrifugados por 30 segundos a 10.000 rpm, e descartado o líquido filtrado do tubo coletor. Após a primeira lavagem, 500  $\mu\text{L}$  do Tampão de Lavagem 2/3 foram adicionados à coluna de purificação e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 segundos, sendo o líquido presente no tubo coletor descartado. Procedeu-se uma nova centrifugação rápida para eliminar qualquer resíduo de líquido presente na coluna de purificação, sendo o líquido residual filtrado descartado, e as colunas de purificação transferidas para um novo tubo coletor de 2 mL, à qual foi adicionada a solução de DNase,

preparada no momento da aplicação (6 µL de tampão 10x DNase + 4 µL DNase + 50 µL de água livre de nuclease) sendo então adicionados 60 µL da solução a cada coluna. As colunas foram incubadas em temperatura ambiente (T.A) por 30 min e adicionou-se 700 µL do Tampão de Lavagem 1 à coluna de purificação, incubando-se por 1 min T.A e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 segundos, descartando-se o filtrado. Foram adicionados 500 µL do Tampão de Lavagem 2/3, centrifugando os tubos novamente a 10.000 rpm por 30 segundos e descartou-se o filtrado. As colunas de purificação foram novamente transferidas para novos tubos coletores de 1,5 mL, e então adicionados 30 µL de solução de eluição. Os tubos foram incubados à T.A por 5 min e, em seguida, centrifugados a 13.400 rpm por 1 min. Foram realizadas duas eluições com o objetivo de recuperar o máximo de RNA final. As colunas de purificação foram descartadas e os tubos contendo o RNA total extraído foram armazenados a - 80°C.

#### **4.3.4.1. Avaliação da qualidade e quantificação de ácidos nucléicos**

A avaliação de pureza e quantificação do RNA total foi realizada por espectrofotometria através de *NanoDrop™ 2000* (Thermo Fisher Scientific), com base nas razões de absorvância dos ácidos nucléicos em 260 nm/230 nm e 260 nm/280 nm, através das quais foi avaliada a presença de contaminantes orgânicos ou inorgânicos, respectivamente.

#### **4.3.4.2. Reação de transcrição reversa (RT) convencional**

Para a síntese do cDNA, foi feita uma reação de transcrição reversa (RT, do inglês, *Reverse Transcription*) na qual foram utilizados 250 ng de RNA total e a enzima transcriptase reversa *Im Prom II Reverse Transcriptase* (Promega). A cada tubo contendo 250 ng de RNA total, foram adicionados 1 µL de *Random Primer* (Hexamer, 250 ng - Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1 µL de mix de dNTP (10 mM - Promega) e quantidade suficiente de água ultrapura para completar o volume de 12 µL. Os tubos foram aquecidos a 65°C por 5 min em termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As amostras foram transferidas para o gelo, e então foram adicionados a cada tubo 7 µL do mix preparado no momento da aplicação (4 µL de tampão da enzima 5x RT (Invitrogen) + 2 µ L de DTT (0,1 M - Invitrogen) + 1 µL de água ultrapura, para cada amostra). A solução foi

homogeneizada por pipetagem, incubada à T.A por 2 min e em seguida foi adicionado 1 µL de *Im Prom II Reverse Transcriptase* a cada tubo. As reações foram incubadas em termociclador por 10 min a 25°C e 50 min a 42°C, com a inativação da enzima feita a 70°C por 15 min. Os tubos contendo o cDNA sintetizado foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

#### **4.3.4.3. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq) convencional**

As reações de PCRq foram realizadas utilizando o sistema *Rotor-Gene Q* (Qiagen) e o reagente intercalante da dupla fita de DNA *QuantiFast SYBR Green PCR Kit* (Qiagen). O gene *β-actina* foi utilizado como controle interno. As sequências dos oligonucleotídeos específicos para cada gene encontram-se no **quadro 4.1**.

**Quadro 4.1** - Sequências de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *RPL5*, *RPL11* (genes-alvo) e *β-actina* (controle interno) na PCRq.

<b>Alvo</b>	<b>Sequência dos oligonucleotídeos (5' - 3')</b>	<b>Tamanho do amplicon (pb)</b>	<b>Referência</b>
<i>RPL5</i>	<b>F:GGTCTCTGTTCCGCAGGATG</b>	102	Desenhado pelo autor
	<b>R:CAGTTTTACCCTCTCGTCGTCT</b>		
<i>RPL11</i>	<b>F:CGCTGGTTCAGCAGAAGTATGA</b>	133	Desenhado pelo autor
	<b>R:GGCCAGGATCCTTTCACAGAA</b>		
<i>β-actina</i>	<b>F:GCACCCAGCACAATGAAG</b>	117	Desenhado pelo autor
	<b>R:CTTGCTGATCCACATCTGC</b>		

Legenda: F: Primer *forward*; R: Primer *reverse*.

As reações de PCRq foram realizadas em triplicata, com dois controles negativos (interno e externo) para cada reação. As reações foram feitas em microtubos (Qiagen) e em rotor de 72 poços, seguindo o protocolo do fabricante. Inicialmente, o cDNA obtido de RNA total a 250 ng foi diluído na razão 1:10 em água ultrapura, sendo as amostras mantidas em gelo até o momento da utilização para

evitar a degradação do material devido à sua alta instabilidade. Em uma capela de fluxo laminar, foi preparado um mix contendo: 3,4  $\mu\text{L}$  de água ultrapura + 0,3  $\mu\text{L}$  de primer *Forward* (10 mM) + 0,3  $\mu\text{L}$  de primer *Reverse* (10 mM) + 5,0  $\mu\text{L}$  de *QuantiFast SYBR Green PCR Kit* (Qiagen). Foram adicionados 9  $\mu\text{L}$  do mix a cada tubo e, posteriormente, fora da capela de fluxo laminar, foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de cDNA diluído a cada tubo, chegando a um volume final de reação de 10  $\mu\text{L}$ . As reações ocorreram de acordo com a seguinte ciclagem:

- 95°C por 10 min;
- 40 ciclos:
  - 95°C por 5 segundos (desnaturação);
  - 60°C por 10 segundos (anelamento, extensão e posterior captura de fluorescência).

Após o término da reação, uma curva de dissociação (ou curva de *Melting*) foi gerada pelo equipamento. Essa curva é analisada com o objetivo de verificar se os produtos obtidos são específicos e se houve formação de estruturas secundárias entre os oligonucleotídeos (como anelamento entre primers) e contaminação na reação (através da análise dos controles negativos). O ciclo de *threshold* (CT, do inglês *Cycle Threshold*), é definido como o ciclo da PCRq no qual o sinal fluorescente do fluoróforo utilizado (nesse caso, o *SYBR GREEN*), atinge um limite previamente definido (o *threshold*). Inicialmente, há poucas cópias do *amplicon* de interesse, e ao longo da reação, ao ultrapassar o *threshold* pré-estabelecido, a reação entra na fase exponencial, ou seja, há a formação exponencial do número de *amplicons*. O valor numérico do CT é inversamente relacionado à quantidade inicial de moldes na reação (ou seja, quanto menor o CT, maior será a quantidade de RNAm de interesse inicial). As análises de expressão foram realizadas pelo método de quantificação relativa do RNAm de cada gene, utilizando o gene  *$\beta$ -actina* como controle interno, pelo método do  $\Delta\text{CT}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Como as reações foram feitas em triplicata, foi feito um cálculo da média dos CTs para cada gene (alvo e controle interno), e foi feita a diferença entre as médias dos CTs ( $\Delta\text{CT}$ ) de cada gene alvo e a média dos CTs do controle interno ( *$\beta$ -actina*). Os cálculos foram realizados através do programa *Microsoft Excel*, e os valores de quantificação relativa para os genes *RPL5* e *RPL11* foram determinados pela fórmula  $2^{-\Delta\text{CT}}$ .

#### **4.3.4.4. Reação de transcrição reversa (RT) para miRNAs**

As análises de expressão de miRNA foram realizadas utilizando o kit comercial *miScript PCR System* (cat. Number 218161 - Qiagen). O RNA total é submetido ao protocolo do *5x miScript HiSpec* - que tem como finalidade avaliar os miRNAs maduros de interesse - que poliadenila miRNAs maduros pela enzima polimerase *poly (A)*. Esses miRNAs são em seguida, transcritos de forma reversa em cDNA utilizando os *primers* oligo-dTs, de forma paralela. Esses oligo-dTs possuem uma sequência 3' degenerada e uma sequência marcada na extremidade 5' que permite a amplificação do miRNA maduro na etapa de PCR em tempo real.

Um total de 250 ng de RNA total foi usado para compor um mix contendo 4 µL do tampão *5x miScript HiSpec*, 2 µL de *10x miScript Nucleic mix*, 2 µL de *miScript Reverse Transcriptase mix* e água ultrapura suficiente para completar o volume final de 20 µL. As reações foram incubadas em termociclador *Veriti* (Applied Biosystems) por 60 min a 37°C e, em seguida, por 5 min a 95°C para inativar a transcriptase reversa. Os tubos contendo o cDNA sintetizado foram armazenados a -20°C até o momento do uso.

#### **4.3.4.5. Reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq) para miRNAs**

Foi utilizado como controle interno, o miRNA de referência RNU-6 (*miScript Primer Assay HS RNU6* – cat. Number 218300 - Qiagen). As reações de PCRq foram realizadas utilizando o sistema *Rotor-Gene Q* (Qiagen) e o reagente intercalante de dupla fita de DNA específico para miRNAs *miScript SYBR Green PCR kit* (cat. Number 218073 - Qiagen).

Todos os pares de *primers* foram adquiridos prontos, desenhados pela empresa (Qiagen), e as reações de PCRq foram realizadas seguindo o protocolo do fabricante. Foram avaliados os seguintes miRNAs-alvos: miR-671-5p e miR-31-5p (que têm como alvo o gene *RPL5*); e miR-212-5p e miR-140-3p (que têm como alvo o gene *RPL11*) (cat. Number de todos os miRNAs utilizados: 218300 – Qiagen).

As reações de PCRq foram realizadas em triplicata, com dois controles negativos (interno e externo) para cada reação. As reações foram feitas em microtubos (Qiagen) e em rotor de 72 poços. Inicialmente, o cDNA obtido de 250 ng de RNA total foi diluído na razão 1:10 em água ultrapura. Em uma capela de fluxo

laminar, foi preparado um mix contendo: 5  $\mu$ L de *2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix* + 1  $\mu$ L de *10x miScript Universal Primer* (constitui o *primer reverse*) + 1  $\mu$ L de *miScript Primer Assay* (constitui o *primer forward*) + 2  $\mu$ L de água ultrapura. Foram adicionados 9  $\mu$ L do mix a cada tubo e, posteriormente, fora da capela de fluxo laminar, foi adicionado 1  $\mu$ L de cDNA diluído a cada tubo, chegando a um volume final de reação de 10  $\mu$ L. As reações ocorreram de acordo com a seguinte ciclagem:

95°C por 15 min;

- 40 ciclos:
  - 94°C por 15 segundos (desnaturação);
  - 55°C por 30 segundos (anelamento)
  - 70°C por 30 segundos (extensão e posterior captura de fluorescência).

Após o fim da reação, foram obtidas as curvas de dissociação, que foram analisadas para a presença de produtos inespecíficos. As análises de expressão foram realizadas pelo método de quantificação relativa, pelo método de  $\Delta$ CT (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Como as reações foram feitas em triplicata, foi feito um cálculo da média dos CTs para cada miRNA (alvo e controle interno), e foi feita a diferença entre as médias dos CTs ( $\Delta$ CT) de cada miRNA alvo e a média dos CTs do controle interno (RNU-6). Os cálculos foram realizados através do programa *Microsoft Excel*, e os valores de quantificação relativa para os miRNAs de interesse foram determinados pela fórmula  $2^{-\Delta CT}$ .

#### **4.3.5. Extração de proteínas**

Essa etapa foi realizada em colaboração com a pesquisadora Dra. Patrícia Possik, no laboratório de Biologia Celular do INCA.

Os tecidos tumorais e de córtex renal normal foram fragmentados com um bisturi e macerados com o auxílio de um pistão para facilitar a digestão do tecido durante a extração, sendo mantidos em gelo seco durante todo o processo. Em seguida, adicionou-se 30  $\mu$ L de tampão de lise celular RIPA (ensaio de precipitação radioimune do inglês, *Radioimmuno Precipitation Assay*) (preparado no momento do uso: 827  $\mu$ L de RIPA - composto por 50 mM de Tris-HCl, 150 mM NaCl, NP 40 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, 01% de sódio dodecil sulfato- + 143  $\mu$ L de inibidor de protease + 10  $\mu$ L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> + 10  $\mu$ L NaF + 2  $\mu$ L pepstatina), ressuspensando o *pellet* com batidas leves no tubo. As amostras foram incubadas por 30 min mantidas em

gelo, homogeneizando-as a cada 10 min. Em seguida, foram centrifugadas a 13.000 rpm por 3 min, a 4°C. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo, e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para a quantificação, realizou-se a diluição do Bradford 5x (*Bio-Rad protein assay*, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA) em água destilada na proporção 1:4. A cada cubeta, foram adicionados 3 µL de amostra e 1 mL da solução de Bradford. As cubetas foram vortexadas e incubadas em T.A por 5 min, e então foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm. Para a quantificação, foi realizada a leitura de amostras para construção da curva padrão com BSA (do inglês, *Bovine Serum Albumin*) em gradiente de concentração de 10 a 0,625 mg/mL. A determinação da quantificação final foi feita com base na curva padrão obtida através do *software Microsoft Excel*.

A partir da determinação final das concentrações obtidas, as amostras foram diluídas com o objetivo de que todas apresentassem a mesma concentração final para a próxima etapa, que é o preparo do gel de corrida.

#### **4.3.5.1. Western blotting**

Após a quantificação, as amostras foram diluídas em tampão RIPA a fim de se obter uma quantidade final de 10 µg de proteína, em um volume final de 12,2 µL. Essas amostras diluídas, adicionadas do tampão de corrida (tampão 5x *Laemmli Sample* com 2-mercaptoetanol – *Bio Rad*) foram aquecidas no momento da corrida do gel, em termociclador, a 95°C por 10 min. Para a corrida, foram utilizados géis comerciais (*4-20% Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels*, Bio-Rad). O tampão de corrida 1x foi preparado a partir da solução concentrada do tampão 10x Tris/Glycine/SDS (Bio-Rad), com 100 mL de solução concentrada e 900 mL de água destilada. Com o sistema montado, foram aplicadas as amostras, e a corrida de separação de proteínas foi realizada a 80 Volts por 2 horas. Durante esse tempo, foi preparado o tampão de transferência, com 80 mL de TBS 10x (do inglês, *Tris Buffered Saline*) + 720 mL de água destilada + 200 mL de metanol, e essa solução foi armazenada a 4°C até o momento do uso.

Ao fim da corrida, foi feita a transferência de proteínas, utilizando o sistema sanduíche contendo a membrana de nitrocelulose. A transferência foi feita a 100 Volts por 1 hora, utilizando a solução gelada e o sistema mantido em gelo durante o

processo. Após a transferência, a membrana foi retirada do sistema e incubada com solução de bloqueio dos sítios não ocupados por 1 hora em T.A sob agitação constante. Essa solução de bloqueio foi preparada com leite em pó desnatado, diluído em TBS-T 0,05% (50 mL de TBS 10x + 450 mL de água destilada + 250 uL de Tween 20). Após o bloqueio, a solução foi descartada e a membrana lavada por 3 vezes com TBS-T 0,05% em intervalos de 10 min, sob agitação constante. Terminada a lavagem, a membrana foi incubada com os seguintes anticorpos primários em solução de TBS-T 0,05%/BSA 4% *overnight*, sob agitação constante a 4°C: *RPL5* (1:1.000, 34 kDa. Ab 86863 - ABCAM, Cambridge, Reino Unido) e *RPL11* (1:1.000, 22 kDa. Ab 79352 - ABCAM).

Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes, em intervalos de 10 min com TBS-T 0,05%, sob agitação constante, e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário (anti-*rabbit*, 1:10.000), em solução de leite e TBS-T 0,05%, por 1 hora em T.A. Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente por 3 vezes com TBS-T 0,05% em intervalos de 10 min e seguiu-se para o processo de revelação, utilizando o reagente *ECL Western Blotting Substrate* (Promega) na proporção 1:1 (solução de peróxido : solução intensificadora de luminol). As membranas foram colocadas em cassete de revelação e expostas a filme sensível à quimioluminescência *Amersham Hyperfilm ECL* (Amersham Biosciences Little Chalfont, Reino Unido), com tempos de exposição entre 1 minuto e 10 segundos. A revelação do filme foi feita de acordo com as instruções do fabricante.

Como o controle constitutivo da reação tinha peso molecular muito próximo das proteínas de interesse, após a revelação, as membranas foram lavadas por 3 vezes com TBS-T 0,05% em intervalos de 10 min, e então incubadas com o anticorpo primário anti- $\beta$ -actina (1 : 5.000, 42 kDa. A5316 - Sigma, St Louis, Missouri, EUA), por 2 horas em T.A. As membranas foram novamente lavadas por 3 vezes com TBS-T 0,05% e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-*mouse* (1:10.000), lavadas e reveladas seguindo o mesmo protocolo anterior, com tempos de exposição variando entre 1 minuto a 2 segundos.

#### **4.3.6. Análises estatísticas - Análises de distribuição, grupos e testes adotados.**

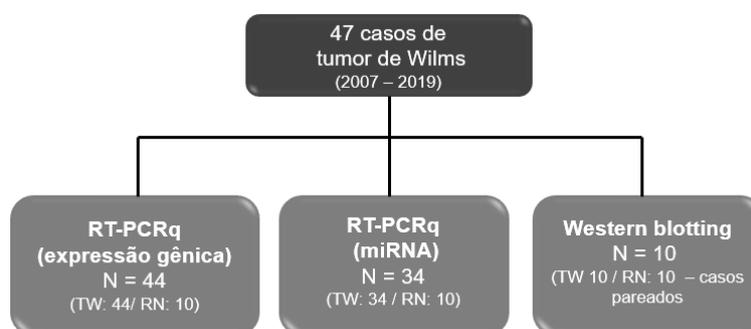
Foi adotado o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar se os valores obedeciam à distribuição normal. Para análises de comparação entre dois grupos de

números amostrais diferentes e com distribuição paramétrica ou não-paramétrica foram adotados os testes de t de Student ou Mann Whitney, respectivamente. Em análises para mais de dois grupos com distribuição paramétrica ou não-paramétrica, os testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis foram utilizados, respectivamente. A análise era seguida dos pós-teste de múltiplas comparações de Tukey ou Dunn, respectivamente. Análises em que um ou mais dos grupos não atingia o valor mínimo de amostras ( $n < 5$ ) para o teste de distribuição de valores foram realizadas pelos testes não-paramétricos previamente citados. Todas as análises de correlação utilizaram teste não-paramétrico de Spearman. A construção dos gráficos e análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism* versão 8.0.1 (Prism). Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. SELEÇÃO DOS CASOS

Inicialmente, 47 casos de pacientes portadores de TW foram selecionados para as análises moleculares. Esses casos foram divididos entre as técnicas realizadas, de acordo com a disponibilidade de tecido tumoral e normal. A distribuição dos casos avaliados em cada metodologia está descrita na **figura 5.1**. As características clínico-patológicas e em quais metodologias cada amostra foi incluída estão descritas detalhadamente no **ANEXO 2**.



**Figura 5.1** - Distribuição dos casos de tumor de Wilms disponíveis no BNT-INCA, entre as técnicas moleculares realizadas.

Um ponto importante a ser destacado é que, nas análises moleculares de validação descritas neste estudo, as amostras não foram avaliadas por componente histológico isolado, como foi o caso do RNA-Seq, do *Infinium* 450K e do microarranjo, em que foi avaliado especificamente o componente blastematoso nas amostras de tumor primário. Nas técnicas de RT-PCRq (tanto para expressão gênica quanto para miRNA) e expressão proteica, as amostras utilizadas continham todos os componentes histológicos, em diferentes proporções. De acordo com a literatura, sabe-se que essa heterogeneidade histológica pode impactar diretamente a expressão de genes e, conseqüentemente, dos miRNAs que têm esses genes como alvos e proteínas codificadas por eles (MASCHIETTO *et al.*, 2008)(SREDNI. *et al.*, 2009)(GADD *et al.*, 2012)(TRINK *et al.*, 2018).

Porém, para amostras congeladas, é inviável realizar a macrodissecção para isolar determinado componente histológico, como pode ser feito em amostras parafinadas. Por outro lado, análises moleculares com amostras FFPE são

dificultadas devido à alta degradação do material genômico, principalmente de RNA, que, além disso, é muito instável. Portanto, apesar de termos selecionado da forma mais homogênea possível a casuística para todas as técnicas avaliadas, este é um viés do nosso estudo, em relação às técnicas realizadas previamente pelo grupo, também descritas no estudo.

## **5.2. DADOS PRÉVIOS DO GRUPO E VALIDAÇÕES EM AMOSTRAS INDEPENDENTES**

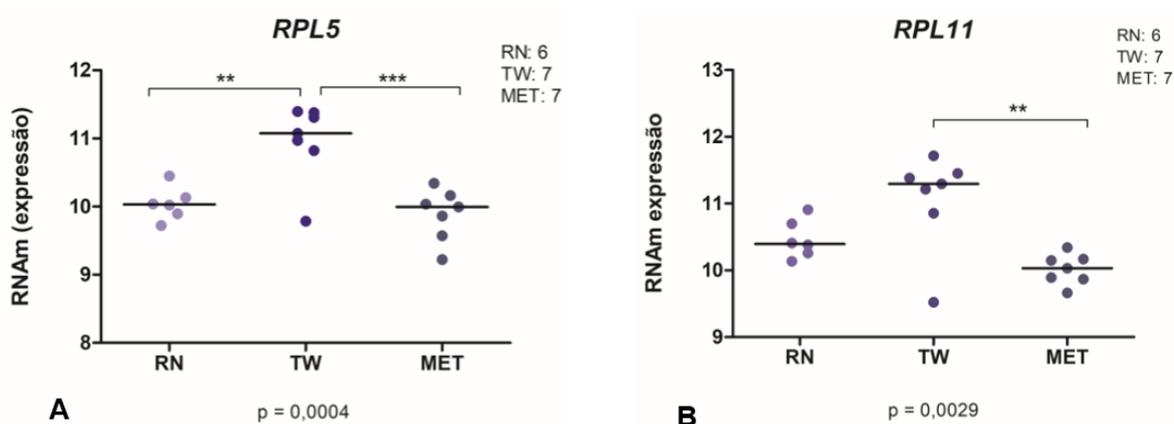
### **5.2.1. Avaliação do perfil de expressão gênica de RPL5 e RPL11**

A partir das análises de expressão diferencial (RNA-seq) de sete casos pareados de RN, TW e MET, foram identificados 196 GDEs entre MET e TW, sendo 58 (29,3%) com perfil de super-expressão, e 138 (70,7%) com perfil de sub-expressão nas amostras de metástase em relação ao tumor primário. Na comparação TW vs RN, foram identificados 2.569 GDEs, dos quais 1.100 (42,8%) apresentavam um perfil de super-expressão e 1.469 (57,2%) um perfil de sub-expressão nas amostras tumorais em relação ao tecido normal. Análises de enriquecimento de vias de sinalização celular (KEGG) dos GDEs usando o genoma humano como *background* foram realizadas no *software* WebGestaltR. Na comparação MET Vs TW, foi identificada apenas a via ribossomal enriquecida, a qual foi também identificada (dentre outras 33 vias) na comparação TW vs RN. A via Ribossomal (hsa03010) é composta por genes que codificam as proteínas ribossomais, as RPs.

Na comparação entre TW vs RN, a via ribossomal foi enriquecida de forma *up*-regulada, com 14 GDEs (FDR =0.020). Já na comparação entre MET Vs TW, a via foi enriquecida de forma *down*-regulada, com 35 GDEs (FDR > 0.01). Dentro desta via, foram identificados 11 genes *RPs* comumente desregulados entre as duas comparações, apresentando todos os 11 genes um perfil de super-expressão no TW em relação ao RN, e de menor expressão em MET em relação ao TW. A partir destes resultados, foi feita uma busca por estudos sobre esses 11 genes a fim de avaliar a relevância no contexto do câncer, com foco principal em tumores pediátricos.

Foram identificados diferentes estudos apontando um papel regulatório chave do gene *RPL5* na via ribossomal, bem como na via MDM2-p53. A desregulação de MDM2-p53 está intimamente relacionada à carcinogênese, além ser regulada por proteínas oncogênicas e supressoras tumorais conhecidas, como MYC e p53,

respectivamente. A maior parte dos estudos encontrados indica que há uma regulação conjunta dessas vias mediada principalmente por *RPL5* juntamente com o *RPL11*. *RPL5* foi identificado diferencialmente expresso (DE) tanto na comparação TW vs RN quanto na comparação MET vs TW, enquanto *RPL11* apresentou-se DE apenas na comparação MET vs TW (**figura 5.2**). Apesar disso, os dois genes apresentavam um mesmo perfil de expressão, em ambas as comparações, assim como todos os outros 11 GDEs comuns às comparações, pertencentes à via ribossomal enriquecida nas nossas análises. Visto que tanto a desregulação da expressão gênica quanto mutações nesses genes já foram associadas a diversos tipos de tumores - como à LLA-T pediátrica, glioblastoma, melanoma, câncer de mama e outros - selecionamos *RPL5* e *RPL11* como alvos do presente estudo (RAO *et al.*, 2012)(DE KEERSMAECKER *et al.*, 2013)(FANCELLO *et al.*, 2017)(BLOMBERG *et al.*, 2018)(JOHANSSON, PETER A. *et al.*, 2020).



**Figura 5.2 - Avaliação da expressão gênica de *RPL5* e *RPL11* em tumores de Wilms para os dados provenientes do RNA-Seq.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de RNAm dos genes *RPL5* (A) e *RPL11* (B) através dos valores de expressão em escala logarítmica (log2) das amostras de cada grupo, obtidas através da técnica de RNA-Seq. Teste ANOVA com pós teste de Tukey (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.01$ ). (RN = Rim normal; TW = Tumor de Wilms - blastema; MET = metástase).

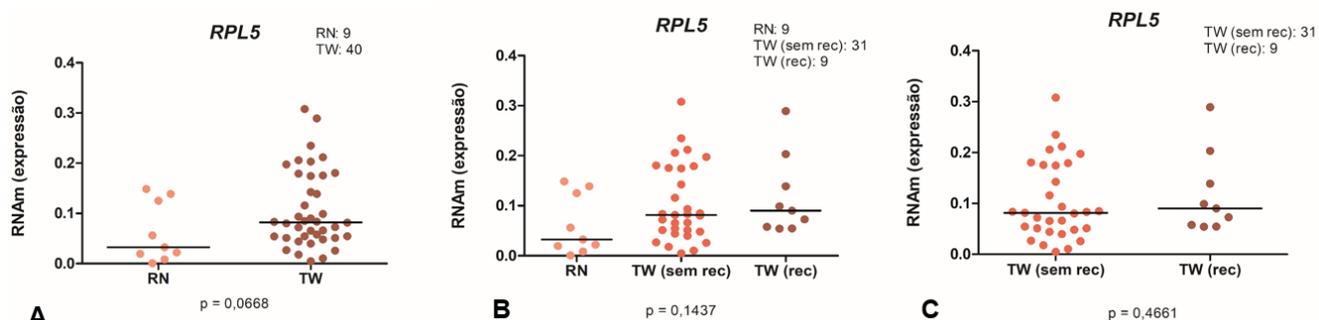
### 5.2.1.1. Validação da expressão de *RPL5* e *RPL11* por RT-PCRq

No presente estudo, foi utilizado para validação um conjunto independente de amostras, sendo estas amostras congeladas armazenadas no BNT-INCA. A análise de transcriptoma foi feita a partir de amostras pareadas de RN, TW e também de amostras metastáticas. No entanto, no BNT-INCA não há amostras metastáticas

disponíveis. Portanto, com o objetivo de avaliar a associação entre a expressão de *RPL5* e *RPL11* e metástase (recidiva da doença), na validação, as amostras de tumor primário foram divididas em dois grupos: um grupo de pacientes que apresentou recidiva da doença Vs um grupo de pacientes que não apresentou recidiva da doença.

Para a validação dos níveis de expressão gênica, foram selecionadas inicialmente 44 amostras de tumor primário e 10 amostras de tecido renal normal para extração de RNA. Quatro amostras tumorais foram excluídas durante a etapa de quantificação de RNA total, pois apresentaram quantificação insuficiente para a reação de síntese de cDNA; e uma amostra de tecido normal foi excluída por não apresentar amplificação do *GAPDH*. Dessa forma, restaram 40 amostras de tumor primário, das quais nove eram provenientes do grupo de pacientes que apresentaram recidiva da doença e 31 do grupo de pacientes que não recidivaram.

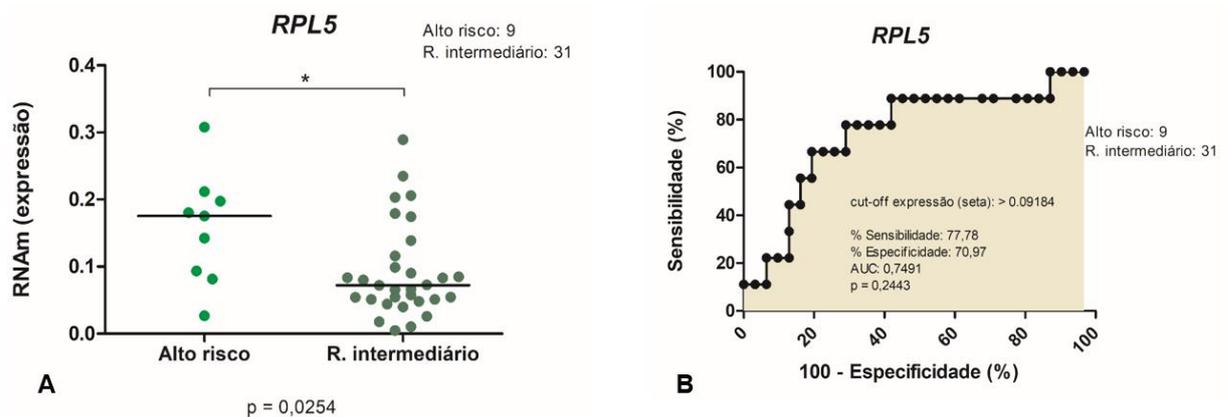
Para o gene *RPL5*, duas amostras não apresentaram amplificação (1 TW e 1 RN). A comparação entre TW e RN não mostrou diferença significativa da expressão de *RPL5* entre os grupos ( $p = 0,0668$ , **figura 5.3A**). Da mesma forma, na comparação entre o grupo normal, recidiva (TW rec) e o grupo sem recidiva (TW sem rec), *RPL5* não se mostrou diferencialmente expresso ( $p = 0,1437$ ; **figura 5.3B**;  $p = 0,4661$ ; **figura 5.3C**).



**Figura 5.3 - Avaliação da expressão gênica de *RPL5* em tumores de Wilms de acordo com o tecido de origem e à presença ou não de recidiva da doença.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de RNAm de *RPL5* detectados por PCRq e normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina, no tecido normal e em TW. **A.** Níveis de expressão entre amostras normais e tumorais; **B.** Níveis de expressão entre pacientes sem recidiva e com recidiva da doença em relação ao tecido normal. Teste ANOVA com pós teste de Tukey; **C.** Níveis de expressão entre pacientes sem recidiva e com recidiva da doença. Teste de Mann-Whitney (Legenda: RN = Rim normal; TW = Tumor de Wilms; TW (sem rec) = Tumor de Wilms sem recidiva; TW (rec) = Tumor de Wilms com recidiva).

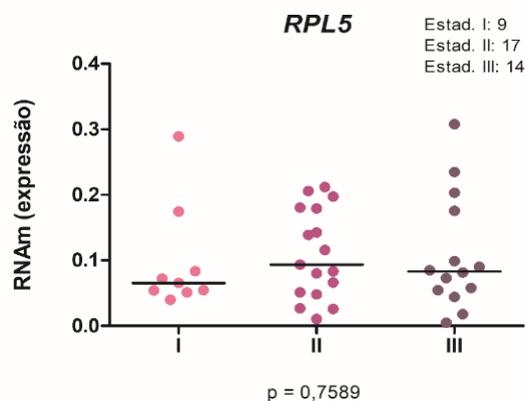
Com o intuito de avaliar se a diferença de expressão identificada pelos dados do RNA-Seq poderia estar associada não à recidiva, mas sim à classificação de risco,

foi feita uma análise entre os grupos de risco: alto risco Vs risco intermediário (**Figura 5.4A**). Nesse caso, os tumores do grupo de alto risco mostraram um maior nível de expressão de *RPL5* quando comparados aos tumores do grupo de risco intermediário ( $p = 0,0254$ ). Para avaliar então o potencial discriminatório da expressão de *RPL5* entre os grupos, foi feita uma análise por curva ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) (**Figura 5.4B**). No entanto, os valores de expressão de *RPL5* não foram capazes de discriminar os pacientes de acordo com o grupo de risco ( $p = 0,2443$ ).



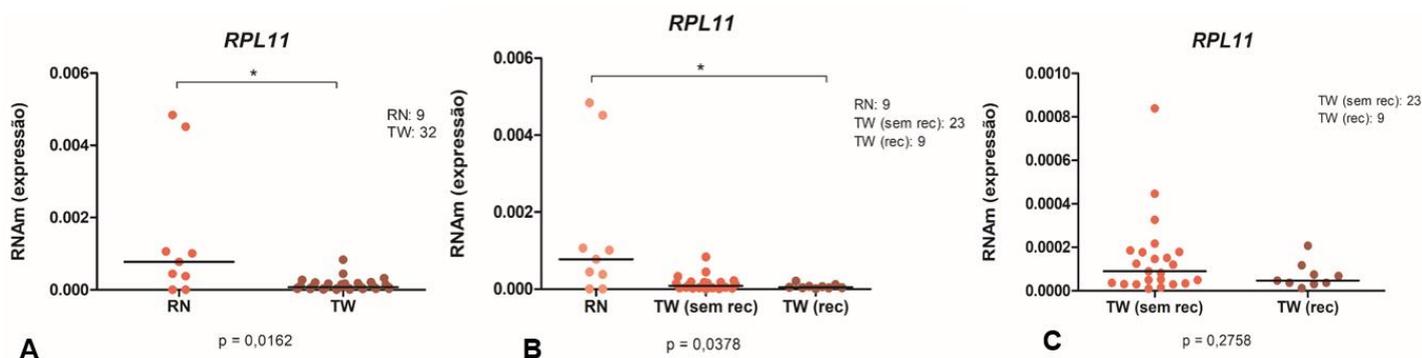
**Figura 5.4 - Avaliação da expressão gênica de *RPL5* em tumores de Wilms de acordo com a estratificação de risco.** **A.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de RNAm de *RPL5* detectados por PCRq e normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina no tecido tumoral, com base na classificação de risco dos pacientes. Teste de Mann-Whitney. **B.** Curva ROC para estabelecimento de um corte de valor de expressão para distinção de pacientes de risco intermediário e alto risco, a partir de amostras de pacientes com tumor de Wilms. (\*  $p < 0.05$ ).

Também foi feita uma análise de acordo com o estadiamento da doença, porém também não foi identificada nenhuma diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,7589$ ) (**Figura 5.5**).



**Figura 5.5 - Análise da expressão gênica de *RPL5* em tumores de Wilms de acordo com o estadiamento da doença.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de RNAm de *RPL5* detectados por PCRq e normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina, nas amostras tumorais. Teste ANOVA com pós teste de Tukey. (I, II e III se referem ao estadiamento patológico da doença no momento do diagnóstico).

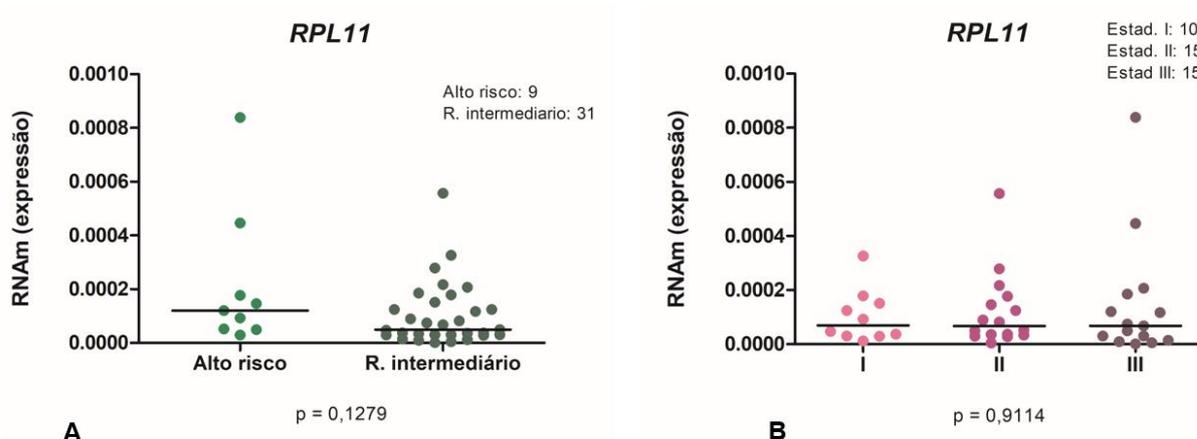
Para o gene *RPL11*, seis amostras tumorais não apresentaram amplificação mesmo após repetições da reação, sendo todas elas pertencentes ao grupo de pacientes que não recidivaram. Além disso, sete amostras de tecido renal normal também não apresentaram amplificação, restando apenas duas amostras desse grupo para as análises estatísticas. Por isso, com o objetivo de manter a comparação do perfil de expressão entre os grupos normal e tumoral, foi aplicado para as amostras que não apresentaram amplificação, a média de amplificação com valor 40, que é o máximo de ciclos avaliados na reação de RT-PCRq. Nesse conjunto de amostras, foi observada uma menor expressão de *RPL11* em amostras tumorais em comparação ao RN ( $p = 0,0162$ ; **figura 5.6A**). Foi observada uma diferença significativa entre o RN e os casos que recidivaram ( $p = 0,0378$ ; **figura 5.6B**) no entanto, não observamos diferenças apenas considerando a recidiva ou não da doença ( $p = 0,2758$ , **figura 5.6C**). Conforme já mencionado, apenas 2 amostras de RN apresentaram expressão do gene *RPL11*. Esse baixo nível de expressão no tecido normal não nos permite uma análise estatística ideal, porém, se excluíssemos todas as amostras não haveria como fazer a representação gráfica. Dessa forma, podemos dizer que o gene *RPL11* é pouco expresso no tecido normal.



**Figura 5.6 - Avaliação da expressão gênica de *RPL11* em tumores de Wilms de acordo com o tecido de origem e à presença ou não de recidiva da doença.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de RNAm de *RPL5* detectados por PCRq e normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina, no tecido normal e em TW. **A.** Níveis de expressão entre amostras normais e tumorais; **B.** Níveis de expressão entre pacientes sem recidiva e com recidiva da doença em relação ao tecido normal. Teste ANOVA com pós teste de Tukey; **C.** Níveis de expressão entre pacientes sem recidiva e com recidiva da doença. Teste

de Mann-Whitney (Legenda: RN = Rim normal; TW = Tumor de Wilms; TW (sem rec) = Tumor de Wilms sem recidiva; TW (rec) = Tumor de Wilms com recidiva).

Também com o intuito de avaliar se a expressão de *RPL11* poderia estar associada não à recidiva, mas sim à classificação de risco, foi feita uma análise entre os grupos de risco. Não observamos diferenças entre os grupos de alto risco e intermediário ( $p = 0,1279$ , **figura 5.7A**). Também foi feita uma análise entre os diferentes níveis de estadiamento da doença, porém também não foi identificada nenhuma diferença significativa da expressão de *RPL11* entre os grupos ( $p = 0,9114$ , **figura 5.7B**).



**Figura 5.7 - Avaliação da expressão gênica de *RPL11* em tumores de Wilms de acordo com a estratificação de risco e o estadiamento da doença.** **A.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de RNAm de *RPL11* detectados por PCRq e normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina no tecido tumoral, com base na classificação de risco dos pacientes. Teste de Mann-Whitney. **B.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de RNAm de *RPL11* detectados por PCRq e normalizados com os níveis de  $\beta$ -actina, nas amostras tumorais. Teste ANOVA com pós teste de Tukey. (I, II e III se referem ao estadiamento patológico da doença no momento do diagnóstico).

De acordo com os resultados obtidos pelas análises aqui descritas, podemos concluir que a expressão dos genes avaliados parece não estar associada ao desenvolvimento e progressão do TW, quando analisado como um todo. Entretanto, não podemos excluir a possibilidade de desregulação desses genes no componente blastematoso.

### 5.2.2. Avaliação do perfil mutacional de *RPL5* e *RPL11*

Os dados provenientes do RNA-Seq das amostras tumorais e metastáticas foram analisados com o objetivo de avaliar a presença de mutações e pequenas inserções e deleções em *RPL5* e *RPL11*.

Não foram identificadas mutações em *RPL5* e *RPL11*, tanto nas amostras tumorais quanto nas metastáticas. Como se observa na literatura, o TW é caracterizado por mutações somáticas em um conjunto de genes relativamente bem definido, portanto, a não identificação de mutações nesses genes nas amostras avaliadas era prevista.

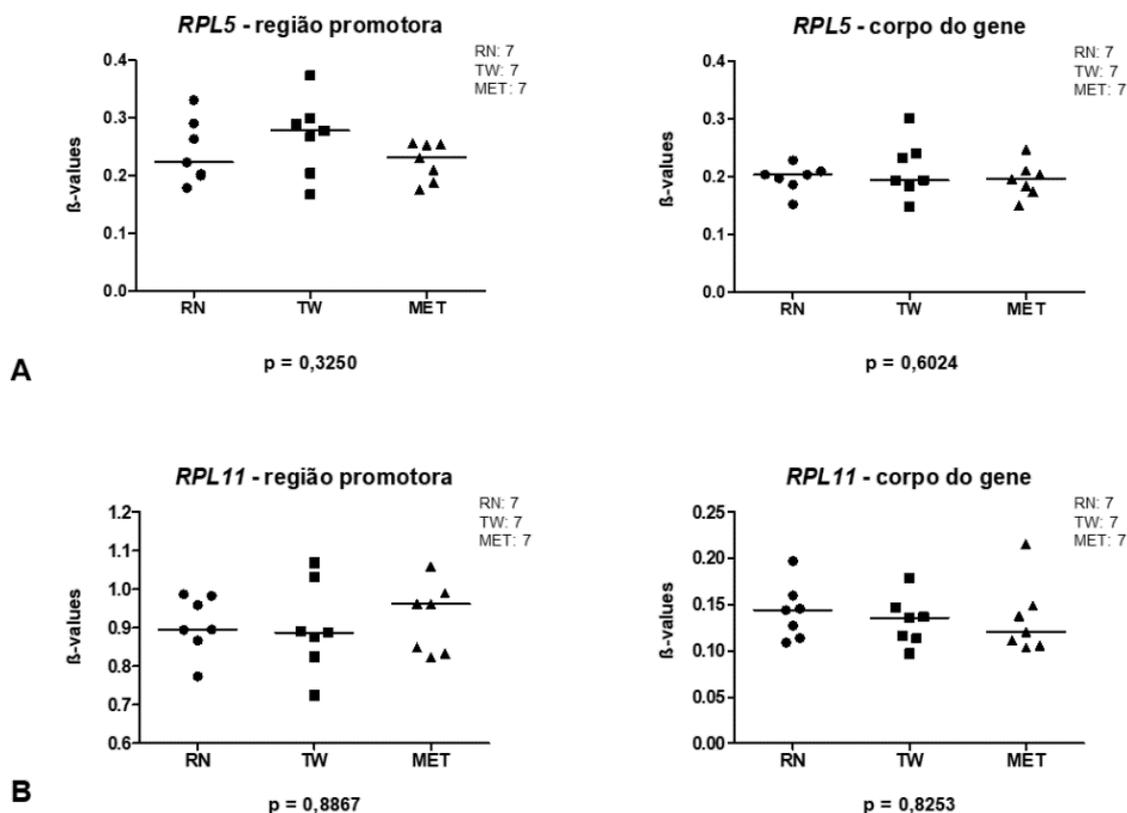
Ainda assim, para confirmar nossos achados em um conjunto maior de amostras, foi avaliada a presença de mutações nestes genes também a partir dos dados depositados pelo estudo TARGET (GADD *et al.*, 2017) no banco de dados *cBioPortal* ([https://www.cbioportal.org/study/summary?id=wt\\_target\\_2018\\_pub](https://www.cbioportal.org/study/summary?id=wt_target_2018_pub)), que avaliou o espectro mutacional de 129 amostras de pacientes portadores de TW. Nesses casos, apenas uma amostra (0,8%) apresentou mutação em *RPL11* e nenhuma mutação foi observada em *RPL5*.

Considerando que não foram identificadas mutações em ambos os genes, não avaliamos a presença de mutações nos genes *RPL5* e *RPL11* em um novo conjunto de amostras neste trabalho.

### **5.2.3. Avaliação do perfil de metilação de *RPL5* e *RPL11***

A partir dos dados gerados pela plataforma *Infinum HumanMethylation 450K Beadchip arrays* (Illumina) em sete casos pareados de RN, TW e MET, foi avaliado se os genes *RPL5* e *RPL11* apresentavam regiões diferencialmente metiladas. Não foram identificadas DMRs alteradas significativamente. Posteriormente, para avaliar minuciosamente o perfil de metilação desses genes, foram selecionadas as sondas que cobriam os genes, sendo essas sondas identificadas a partir do banco de dados *UCSC Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>) e, então, identificadas também na lista de dados gerados pela plataforma 450k. A partir dos  $\beta$ -values, foram avaliados os níveis de metilação considerando as médias dos valores de metilação das sondas tanto nas regiões promotoras quanto no corpo do gene, e da mesma forma, não foram identificadas diferenças significativas de metilação (**figura 5.8A e B**). Sendo assim, a validação do perfil de metilação não foi realizada, pois assume-se que esse resultado

indica que a metilação pode não ter efeito significativo na desregulação da expressão desses genes.



**Figura 5.8 – Análise do perfil de metilação de *RPL5* e *RPL11* em tumores de Wilms na região promotora e corpo do gene.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação dos genes *RPL5* (A) e *RPL11* (B) através da média dos valores de metilação (B-values) das regiões promotoras e do corpo do gene, das amostras de cada grupo, obtidas através da técnica de microarranjo de metilação. Teste ANOVA com pós teste de Tukey. (RN = Rim normal; TW = Tumor de Wilms – blastema; MET = metástase).

#### 5.2.4. Avaliação do perfil de expressão de miRNAs que têm *RPL5* e *RPL11* como alvos

Inicialmente, foi feita uma busca por miRNAs que tenham os genes *RPL5* e *RPL11* como alvos através do banco de dados TarBase v.8 (KARAGKOUNI *et al.*, 2018), miRBase (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019) e TargetScanHuman (MCGEARY *et al.*, 2019). Observamos quais miRNAs eram comuns à mais de um banco para obter uma maior consistência entre os resultados, considerando que a descrição de miRNAs e seus genes-alvo pode variar entre os

bancos A partir dessa lista de miRNAs, foi verificado se estes apresentavam-se DE nos dados gerados pelo microarranjo do nosso grupo pela plataforma *miRNA 4.0 Array* (Affymetrix), a partir da comparação de 20 casos de TW (especificamente o componente blastematoso) e cinco casos de RN. Foram feitas comparações entre TW e RN, utilizando  $p < 0,05$  como critério de expressão diferencial determinada por uma abordagem bayesiana empírica usando o pacote limma (RITCHIE *et al.*, 2015).

Sobrepondo a lista de miRNAs preditos que têm *RPL5* como alvo com a lista de miRNAs DE dos nossos casos, identificamos 11 miRNAs candidatos. Destes 11, três miRNAs apresentavam-se menos expressos no TW em relação ao RN, e oito mais expressos. Seguindo a mesma metodologia para *RPL11*, identificamos 10 miRNAs DE que tem este gene como alvo, sendo três menos expressos no TW em relação ao RN, e sete mais expressos. Esses miRNAs estão apresentados no **Quadro 5.1**.

**Quadro 5.1** - MiRNAs identificados como DE nos dados do microarranjo, que tem os genes *RPL5* e *RPL11* como alvos, respectivamente. Os miRNAs em vermelho apresentaram perfil de sub-expressão nas amostras tumorais em relação às normais e os miRNAs em verde, perfil de super-expressão nas amostras tumorais em relação às normais

<i>RPL5</i>	<i>RPL11</i>
miR-484	miR-212-5p
miR-31-5p	miR-140-3p
miR-671-5p	miR-5699-3p
miR-149-5p	miR-17-5p
miR-324-5p	miR-93-5p
miR-34a-5p	miR-132-3p
miR-103a-5p	miR-148b-3p
miR-106a-5p	miR-20b-5p
miR-107	miR-324-5p
miR-218-5p	miR-331-3p
miR-3613-5p	

Considerando que *RPL5* e *RPL11* apresentavam-se super-expressos nas amostras tumorais em relação às normais a partir dos dados do transcriptoma, os miRNAs a serem selecionados deveriam ter um perfil de expressão oposto dentro da mesma comparação. Isso porque a regulação dos miRNA - RNAm se dá de forma inversa, ou seja, quanto maior a expressão de um miRNA, menor a expressão de seu alvo (CROCE, 2009).

Desta forma, para os três miRNAs sub-expressos para cada gene, foi feita uma busca na literatura no Pubmed de forma a avaliar os estudos disponíveis sobre esses miRNAs no contexto do câncer e principalmente em tumores pediátricos. No contexto de câncer em geral, foram identificados poucos estudos, enquanto em relação a tumores pediátricos não foi identificado nenhum estudo envolvendo esses miRNAs. Ainda, além das análises com os dados de microarranjo, foram realizadas análises *in silico* com dados depositados no banco de dados GEO de um estudo publicado por LUDWIG e colaboradores em 2016 (LUDWIG *et al.*, 2016). Neste estudo também foi avaliada a expressão de miRNAs em amostras de pacientes com TWs pela técnica de microarranjo, para identificar se havia expressão diferencial entre amostras tumorais e normais.

Com base na literatura disponível e nas análises estatísticas realizadas com os seis miRNAs DE, foram selecionados para validação dois miRNAs para cada gene alvo: miR-671-5p e miR-31-5p que tem como alvo o gene *RPL5*; miR-212-5p e miR-140-3p que tem como alvo o gene *RPL11*.

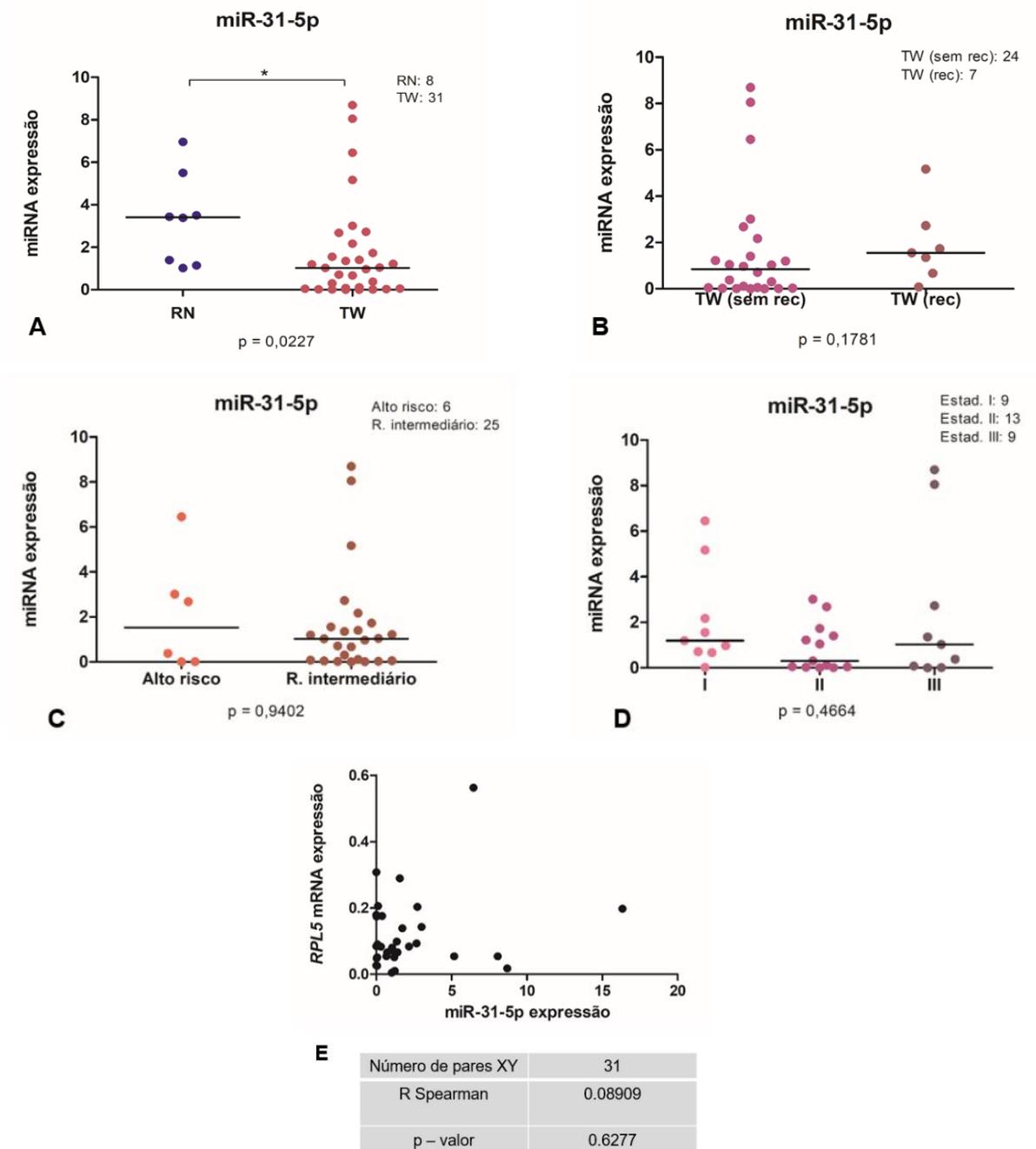
#### 5.2.4.1. Validação da expressão dos miRNAs selecionados

Com o objetivo de identificar um possível mecanismo relacionado à desregulação da expressão dos genes *RPL5* e *RPL11* nos dados do RNA-Seq, avaliamos o perfil de expressão dos quatro miRNAs selecionados, identificados como DE previamente nos dados de microarranjo do grupo.

Para essa análise foram selecionadas inicialmente 34 amostras de TW e 10 amostras de RN. Três amostras de TW e uma de RN foram excluídas durante a etapa de quantificação de RNA total, pois apresentaram quantificação insuficiente para a reação de síntese de cDNA. Das 31 amostras tumorais restantes, 7 eram provenientes de pacientes do grupo que apresentou recidiva da doença e 24 do grupo de pacientes sem recidiva da doença. Todas as reações foram realizadas em triplicata, e o miR-U6 utilizado como controle interno.

Foi possível detectar a expressão do miR-31-5p, que tem *RPL5* como alvo, em todas as amostras avaliadas. Nossas análises mostraram uma menor expressão de miR-31-5p em TW em comparação com RN ( $p = 0,0227$ , **figura 5.9A**). Por outro lado, as comparações entre os grupos sem recidiva Vs recidiva ( $p = 0,1781$ , **figura 5.9B**), alto risco Vs risco intermediário, ( $p = 0,9402$ , **figura 5.9C**) e de acordo com o estadiamento ( $p = 0,4664$ , **figura 5.9D**) não mostraram diferenças significativas.

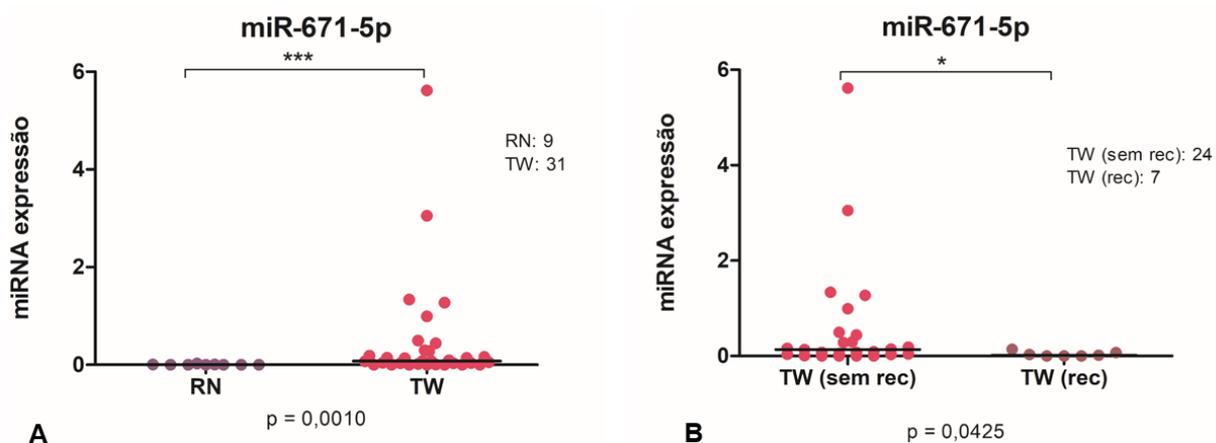
Finalmente, verificamos se havia correlação entre os níveis de expressão de *RPL5* e de miR-31-5p, porém não observamos correlação significativa entre os dados ( $p = 0,6277$ , **figura 5.9E**).

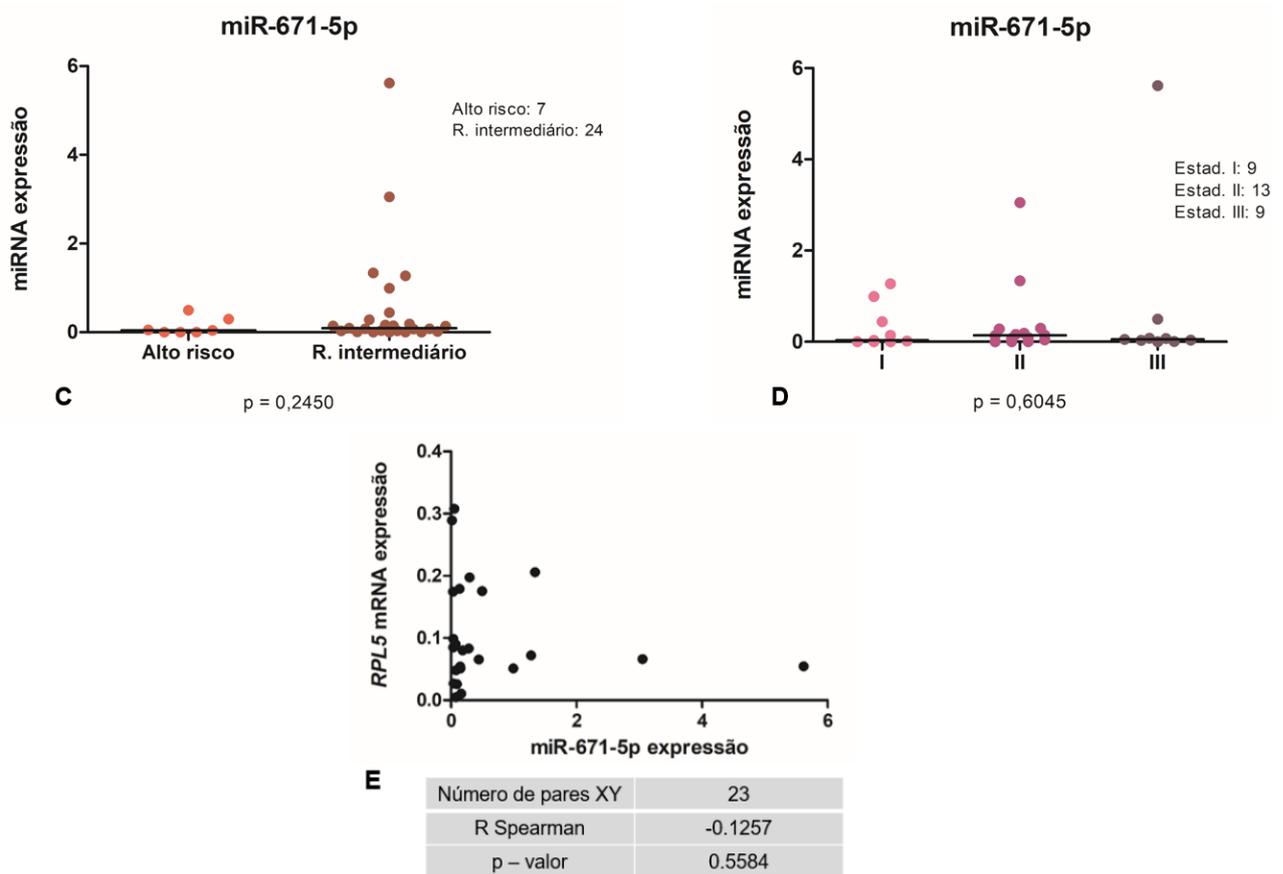


**Figura 5.9 - Análise da expressão do miR-31-5p que tem o gene *RPL5* como alvo, em tumores de Wilms, e associação às variáveis clínico-patológicas avaliadas.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de expressão do miR-31-5p através dos valores de expressão detectados por PCRq e normalizados com os níveis do miR-U6, no tecido normal e em TW. **A.** Níveis de expressão entre amostras normais e tumorais, teste Mann Whitney; **B.** Níveis de expressão das amostras tumorais entre pacientes sem recidiva e com recidiva da doença, teste Mann Whitney; **C.** Níveis de expressão das amostras tumorais de acordo com a estratificação de risco, teste Mann Whitney; **D.** Níveis de expressão das amostras tumorais de acordo com o estadiamento da doença, teste ANOVA com pós teste de

Tukey; **E.** Correlação entre os níveis de expressão do miR-31-5p e de RNAm de seu gene alvo, *RPL5* nas amostras tumorais de pacientes com TW; teste de Spearman. (Legenda: RN: Rim normal; TW: Tumor de Wilms; TW (sem rec) = Tumor de Wilms sem recidiva; TW (rec) = Tumor de Wilms com recidiva. I, II e III se referem ao estadiamento patológico da doença no momento do diagnóstico) (\*  $p < 0.05$ ).

Para o miR-671-5p, que tem *RPL5* como alvo, das nove amostras de RN que foram incluídas nas reações, oito não apresentaram amplificação mesmo após repetição da reação. Já que restaria apenas uma amostra para as análises estatísticas, foi aplicado para este miRNA o ciclo de amplificação máximo, de 40, para tornar possível a comparação com as amostras normais. Outras oito amostras tumorais também não apresentaram amplificação, sendo cinco provenientes de pacientes do grupo que não apresentou recidiva da doença e três do grupo de pacientes que apresentou recidiva da doença. Também adotamos a média de amplificação de 40 para estas amostras. Para este miRNA, uma maior expressão foi observada em TW em comparação a RN ( $p = 0,0010$ , **figura 5.10A**). Uma maior expressão de miR-671-5p também foi observada no grupo sem recidiva comparado ao grupo com recidiva ( $p = 0,0425$ , **figura 5.10B**). Para as comparações entre as classificações de risco (alto risco Vs risco intermediário;  $p = 0,2450$ , **figura 5.10C**) e estadiamento ( $p = 0,6045$ , **figura 5.10D**), não identificamos diferenças significativas. Também não observamos correlação significativa entre os níveis de expressão de *RPL5* e de miR-671-5p ( $p = 0,5584$ , **figura 5.10E**).

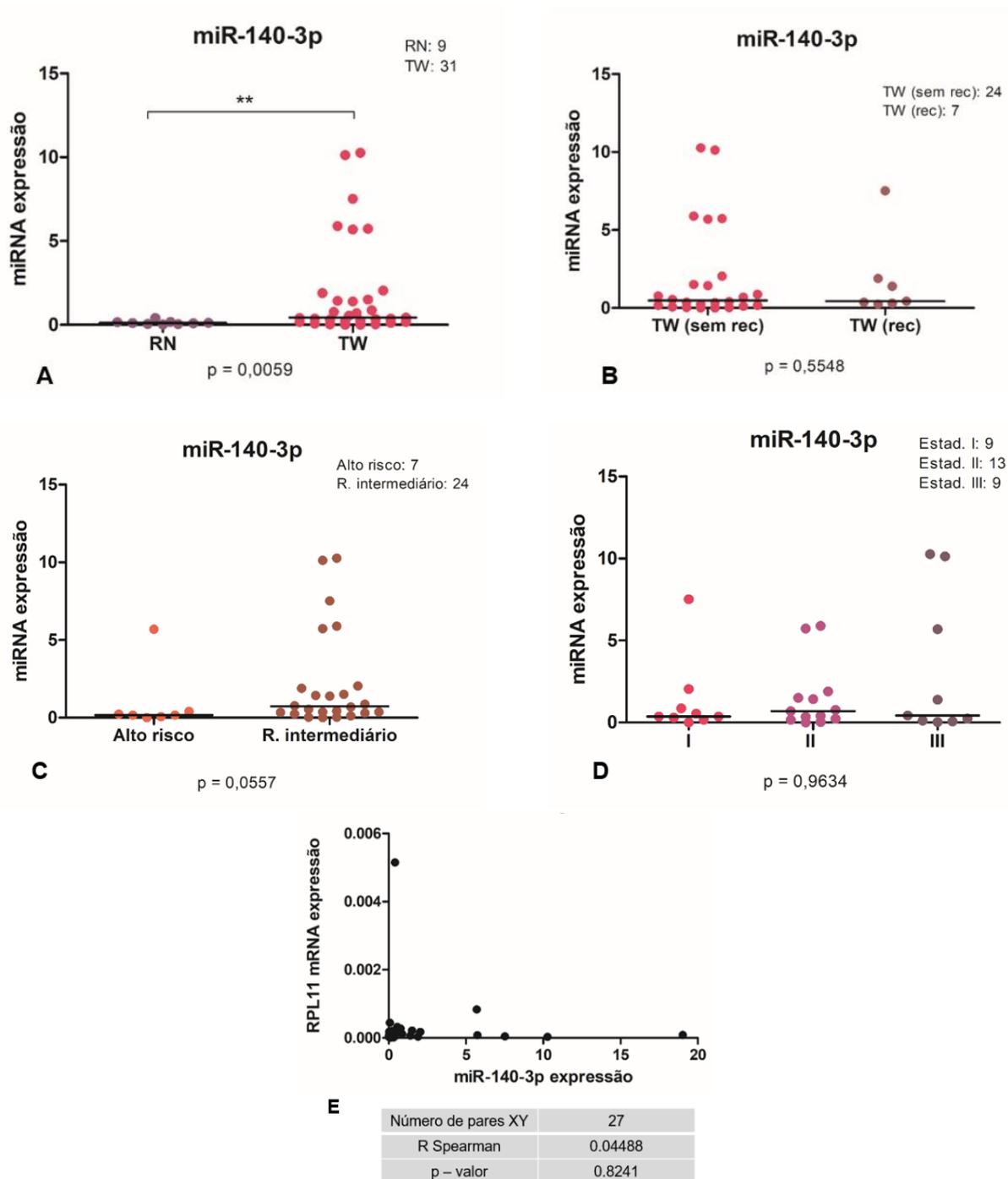




**Figura 5.10 - Análise da expressão do miR-671-5p que tem o gene *RPL5* como alvo, em tumores de Wilms, e associação às variáveis clínico-patológicas avaliadas.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de expressão do miR-671-5p através dos valores de expressão detectados por PCRq e normalizados com os níveis do miR-U6, no tecido normal e em TW. **A.** Níveis de expressão entre amostras normais e tumorais, teste Mann Whitney; **B.** Níveis de expressão das amostras tumorais entre pacientes sem recidiva e com recidiva da doença, teste Mann Whitney; **C.** Níveis de expressão das amostras tumorais de acordo com a estratificação de risco, teste Mann Whitney; **D.** Níveis de expressão das amostras tumorais de acordo com o estadiamento da doença, teste ANOVA com pós teste de Tukey; **E.** Correlação entre os níveis de expressão do miR-671-5p e de RNAm de seu gene alvo, *RPL5* nas amostras tumorais de pacientes com TW; teste de Spearman. (Legenda: RN: Rim normal; TW: Tumor de Wilms; TW (sem rec) = Tumor de Wilms sem recidiva; TW (rec) = Tumor de Wilms com recidiva. I, II e III se referem ao estadiamento patológico da doença no momento do diagnóstico) (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.01$ ).

Para o miR-140-3p que tem *RPL11* como alvo, todas as amostras apresentaram amplificação. A única diferença significativa identificada durante as análises foi na comparação entre RN Vs TW, em que tumores apresentaram maior nível de expressão ( $p = 0,0059$ , **figura 5.11A**). Para as demais comparações, nenhuma diferença significativa foi observada (**figura 5.11B - D**), assim como não foi

observada correlação entre os níveis de expressão do miR-140-3p e de seu gene alvo, *RPL11* ( $p = 0,8241$ , **figura 5.11E**).



**Figura 5.11 - Análise da expressão do miR-140-3p que tem o gene *RPL11* como alvo, em tumores de Wilms, e associação às variáveis clínico-patológicas avaliadas.** Gráfico de pontos mostrando os níveis de expressão do miR-140-3p através dos valores de expressão detectados por PCRq e normalizados com os níveis do miR-U6, no tecido normal e em TW. **A.** Níveis de expressão entre amostras normais e tumorais, teste Mann Whitney; **B.** Níveis de expressão das amostras tumorais entre pacientes sem recidiva e com recidiva da doença, teste Mann Whitney; **C.** Níveis de expressão das amostras tumorais de acordo com a estratificação de risco, teste Mann Whitney; **D.** Níveis de expressão

das amostras tumorais de acordo com o estadiamento da doença, teste ANOVA com pós teste de Tukey; E. Correlação entre os níveis de expressão do miR-140-3p e de RNAm de seu gene alvo, *RPL11* nas amostras tumorais de pacientes com TW; teste de Spearman. (Legenda: RN: Rim normal; TW: Tumor de Wilms; TW (sem rec) = Tumor de Wilms sem recidiva; TW (rec) = Tumor de Wilms com recidiva. I, II e III se referem ao estadiamento patológico da doença no momento do diagnóstico) (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

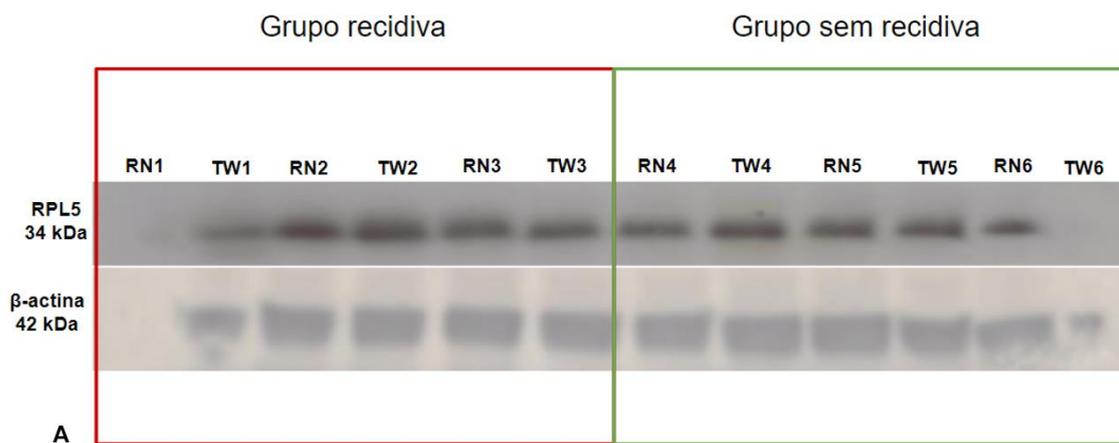
Para o miR-212-5p, não foi observada a amplificação de nenhuma amostra, mesmo após testes com novo cDNA e com troca de *primers* e demais reagentes do *mix*. Dessa forma, optamos por excluir esse miRNA das análises.

De forma geral, observamos algumas diferenças de expressão entre as amostras normais e tumorais, que corroboram os dados prévios do grupo para o miR-31-5p; enquanto para os outros dois miRNAs (miR-671-5p e miR-140-3p) observamos perfis inversos aos dados do microarranjo. Além disso, não foi possível associar os dados de expressão à recidiva, classificação de risco e estadiamento de nenhum dos miRNAs de forma relevante, visto que apenas para o miR-671-5p foi observada uma diferença significativa entre os grupos com e sem recidiva da doença. Também não observamos nenhuma correlação entre os níveis de expressão dos miRNAs e seus genes-alvo. Porém, cabe ressaltar que, em humanos, o pareamento entre miRNA e RNAm-alvo geralmente se dá de forma incompleta, ou seja, o miRNA leva à inibição da tradução e não à degradação do RNAm. Assim, partimos para a avaliação da expressão proteica de RPL5 e RPL11.

#### **5.2.5. Avaliação da expressão proteica de RPL5 e RPL11**

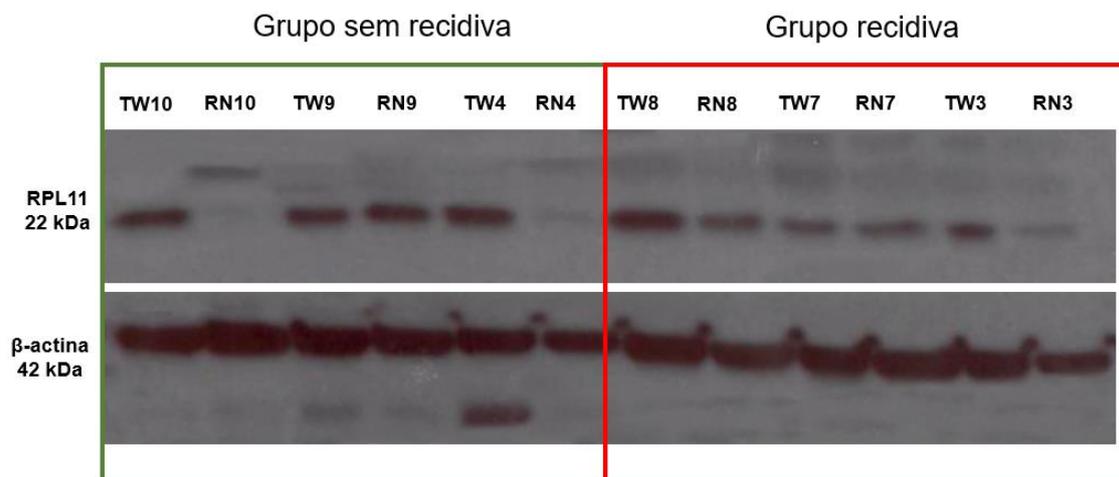
A técnica de Western blotting foi utilizada com o objetivo de visualizar os níveis de expressão das proteínas codificadas por *RPL5* e *RPL11*. Para este experimento, foram utilizadas amostras pareadas (do mesmo paciente), de TW e RN, com características clínico-patológicas similares às que geraram os dados iniciais de expressão gênica (risco intermediário, histologia mista); de forma a obter um conjunto amostral o mais homogêneo possível. Além da comparação entre TW e RN, a única variável de interesse a ser avaliada nesse momento seria a recidiva ou não da doença.

Não observamos diferença nos níveis de expressão de RPL5 entre TW e RN, nem entre os grupos com e sem recidiva da doença. As amostras RN1 e TW6 apresentaram problemas durante a corrida do gel, não detectando a expressão de RPL5 (**Figura 5.12**).



**Figura 5.12** - *Western blotting* de extrato protéico total obtido de amostras pareadas (RN e TW) e entre grupos com e sem recidiva da doença, para avaliar o nível de expressão da proteína codificada pelo gene *RPL5* no qual o gene *β-actina* foi utilizado como controle da reação.

Para *RPL11*, observamos uma maior expressão em amostras tumorais em comparação às amostras de rim normal, sendo essa diferença mais evidente entre os pares de amostras 3, 8, 4 e 10 (**Figura 5.13**). Essas amostras têm os níveis de expressão proteica similares aos níveis de expressão observados pelo RNA-Seq, no qual as amostras normais expressam níveis menores em relação às amostras tumorais. Em relação às diferenças de expressão entre os grupos com e sem recidiva da doença, não foi possível observar diferença.



**Figura 5.13** - *Western blotting* de extrato protéico total obtido de amostras pareadas (RN e TW) e entre grupos com e sem recidiva da doença, para avaliar o nível de expressão da proteína codificada pelo gene *RPL11* no qual o gene *β-actina* foi utilizado como controle da reação.

De forma geral, para RPL5, não observamos diferença nos níveis de expressão proteica, nem mesmo entre as amostras normais e tumorais. Já para RPL11, foi possível observar uma diferença entre os níveis de expressão de amostras normais e tumorais para alguns casos, corroborando com os dados prévios obtidos através do RNA-Seq. Porém, a maior expressão proteica de RPL11 em amostras de TW não parece estar associada à expressão de miR-140-3p, uma vez que esse miR está mais expresso nos tumores.

## 6. DISCUSSÃO

Apesar de ser já bem determinado que os tumores pediátricos são caracterizados por uma frequência relativamente baixa de alterações genéticas enquanto apresentam, em sua maioria, alterações epigenéticas, ainda se sabe relativamente pouco sobre como essas alterações estão associadas ao desenvolvimento e, menos ainda, à progressão tumoral. Portanto, há um interesse cada vez maior em identificar como tais alterações podem estar associadas a esses processos e em que momento elas ocorrem. No entanto, além de se identificar esses mecanismos, é de extrema importância entender de que forma eles podem estar associados ao desenvolvimento e progressão tumoral. Por isso, é muito importante que se faça a integração de dados de alterações em diversos níveis celulares para identificar possíveis vias e mecanismos associados a esses processos em vários tipos de câncer, incluindo o TW. No nosso estudo, abordamos de forma ampla essas possíveis alterações visando entender de que forma elas podem estar relacionadas às características clínico-patológicas dos pacientes além de contribuir para o melhor entendimento da biologia do tumor.

A persistência do componente blastematoso no tumor após o tratamento é determinante na estratificação de risco dos pacientes, sugerindo que a caracterização das alterações moleculares relacionadas pode ajudar a identificar pacientes mais propensos a se beneficiarem de protocolos de tratamento mais ou menos agressivos. Ao analisarmos o transcriptoma do componente blastematoso dos TWs e de amostras metastáticas, identificamos a desregulação da via ribossomal, amplamente associada a desordens hematológicas como a DBA, associada a mutações em vários genes ribossomais. Além disso, estudos mostram que algumas *RPs* são superexpressas em diversos tumores, o que foi identificado nos nossos dados de RNA-Seq, no qual observamos que o TW apresentou um perfil de superexpressão em relação ao RN. A superexpressão de *RPs* pode promover a tumorigênese por interações com a via supressora de tumor p53 e também por efeitos diretos em vários oncogenes, apontando para um amplo papel das alterações das *RPs* em doenças hematológicas e oncológicas (SHENOY *et al.*, 2012).

Apesar de mutações em genes da via ribossomal serem descritas em uma ampla gama de tumores como LLA-T pediátrica, glioblastoma, melanoma, câncer de mama e mieloma múltiplo (DE KEERSMAECKER *et al.*, 2013)(LAWRENCE *et al.*,

2014)(FANCELLO *et al.*, 2017)(ORŠOLIĆ *et al.*, 2020), observamos que as alterações de expressão gênica observadas no RNA-Seq não foram associadas a mutações em *RPL5* ou *RPL11* nas nossas análises. Dessa forma, investigamos se a expressão diferencial desses genes poderia ser observada nos tumores como um todo (e não exclusivamente no componente blastematoso). Através dessas análises, observamos de forma significativa apenas que os níveis de expressão de *RPL5* são mais altos no grupo de pacientes classificados como de alto risco

. Para as demais análises associadas a outras características clínico-patológicas, não identificamos alterações significativas em nenhum dos genes.

Embora os níveis alterados de expressão de *RPL5* e *RPL11* pareçam ser comuns no câncer, não está claro se essas alterações são uma causa ou consequência da tumorigênese (WANG *et al.*, 2015). A superexpressão de *RPL5* foi relatada em câncer de pulmão de células não pequenas e em câncer de mama, sendo também associada à resposta ao tamoxifeno neste último (HELLWIG *et al.*, 2016). Em mieloma múltiplo, pacientes com baixos níveis de expressão de *RPL5* apresentaram pior sobrevida global. No entanto, ensaios clínicos revelaram que pacientes com mieloma múltiplo com baixa expressão de *RPL5* respondem melhor ao bortezomibe (um inibidor de proteassoma) em comparação com pacientes com alta expressão desse gene (HOFMAN *et al.*, 2017). A superexpressão de *RPL11* foi relatada como um potencial biomarcador de resposta ao tratamento em pacientes com tumores gástricos e foi associada a um melhor prognóstico nesses casos (KAWAHATA *et al.*, 2020). *RPL5* e *RPL11* podem atuar na carcinogênese por diversos mecanismos, incluindo a regulação da via MDM2-p53 (HORN; VOUSDEN, 2008). Além disso, a via RP-MDM2-p53 foi proposta como alvo terapêutico candidato para alguns tumores pediátricos como neuroblastoma (BARBIERI *et al.*, 2013) e TW (GELLER; HOHENSTEIN, 2014).

Nosso estudo mostrou que *RPL5* e *RPL11* não são afetados por mutações em TW - o que está de acordo com a baixa carga mutacional já relatada nesses tumores (GADD *et al.*, 2017). Por outro lado, as alterações na expressão gênica podem ser dependentes do componente histológico. No entanto, sabemos que esta informação é limitada pela falta de análises de expressão dos outros componentes dentro do mesmo tumor. Ou seja, temos apenas informações sobre a expressão desses genes no componente blastematoso, mas não temos tal informação sobre os componentes estromal e epitelial. A análise de RNA-Seq mostrou uma superexpressão de ambos

os genes no componente blastematoso do tumor, mas o mesmo não foi observado quando os tumores como um todo foram analisados por RT-PCRq.

Os TWs apresentam altas frequências de alterações epigenéticas (SCOTT *et al.*, 2012b); no entanto, nos nossos dados, também não identificamos alterações nos níveis de metilação do DNA tanto na região promotora quanto no corpo dos genes *RPL5* e *RPL11*, que pudessem ser associadas às diferenças de expressão observadas nas amostras avaliadas. Buscamos avaliar um outro mecanismo epigenético também muito explorado em TW, que são as alterações em miRNAs, selecionando para essas análises, miRNAs que tenham *RPL5* e *RPL11* como alvos. De acordo com a literatura, há um aumento cada vez maior de evidências sobre o papel dos miRNAs na regulação da biogênese ribossomal. No entanto, ainda há poucas evidências de como esse mecanismo pode atuar nesse contexto, e por isso, explorar tal associação é relevante para o nosso estudo. Nossas análises não identificaram nenhuma associação dos miRNAs selecionados com seus respectivos genes-alvo, bem como não identificamos nenhuma associação da expressão destes com as características clínico-patológicas avaliadas. No entanto, sabemos que os miRNAs podem ter diversos genes-alvo, o que nos leva a crer que apesar de não termos observado diferenças significativas nas nossas análises, esses miRNAs podem atuar em outras vias e processos biológicos que podem ter impacto direto na desregulação da via ribossomal, como por exemplo, a via de p53, à qual de acordo com informações do banco de dados KEGG, o miR-671-5p está relacionado. Apesar de ser uma via na qual diversos genes e miRNAs estão relacionados, sabemos que é uma via importante no contexto da biogênese ribossomal, e por isso, mesmo alterações em outros genes e mecanismos da via podem impactar as RPs. Essa relação se aplica da mesma forma para os demais miRNAs avaliados, que, assim como seus genes-alvo, podem estar relacionados a outras vias e processos que podem ter impacto direto na via ribossomal e nos genes que a constituem.

Considerando que alterações de expressão gênica podem impactar diretamente os níveis de proteína codificados pelo respectivo gene, avaliamos também os níveis proteicos de *RPL5* e *RPL11*. Os níveis de proteína diferiram apenas para *RPL11*, sendo que os níveis mais altos de expressão proteica nos tumores foram observados apenas em um subconjunto de pares TW-RN, enquanto para *RPL5* nenhuma diferença foi visivelmente observada. Considerando que os miRNAs levam à inibição da tradução, procuramos identificar alguma associação entre os níveis de

expressão dos miRNAs avaliados e os níveis de expressão proteica de RPL5 e RPL11, no entanto, também não encontramos nenhuma associação. A heterogeneidade histológica característica do TW pode afetar diretamente a expressão gênica e proteica, conforme descrito na literatura. Cada subtipo histológico pode ter um perfil de expressão gênica distinto e até único e, assim, a comparação de genes expressos em um subtipo histológico isolado e em um tecido com histologia mista pode ser diferente (GADD *et al.*, 2012)(TRINK *et al.*, 2018). No presente estudo, avaliamos inicialmente os níveis de expressão de *RPL5* e *RPL11* apenas no componente blastematoso. No conjunto de validação, avaliamos o tumor total, independente da histologia, o que pode ter afetado os resultados. No entanto, seria importante e até mesmo mais relevante, identificar um biomarcador tumoral independentemente de sua histologia, pois dessa forma, um maior número de pacientes seria beneficiado. Atualmente, a heterogeneidade intratumoral dos subtipos histológicos é determinada exclusivamente pelo patologista, podendo variar de acordo com diversos fatores, tornando necessária a utilização de marcadores adicionais. Prospectivamente, um protocolo denominado “UMBRELLA” tem buscado implementar a avaliação por imagem associada à avaliação do patologista com o objetivo de se determinar o volume residual dos componentes histológicos, e não mais a porcentagem deles, visando obter uma medida mais precisa de tais componentes, e, dessa forma, garantir uma correta classificação de risco dos pacientes e conseqüentemente, o tratamento adequado (VUJANIĆ *et al.*, 2018). Em nosso estudo, o gene *RPL5* foi relacionado à predominância do componente blastematoso, uma vez que sua maior expressão foi associada aos casos classificados como alto risco, embora a curva ROC tenha mostrado que esse marcador não se mostrou robusto o suficiente para a discriminação entre os grupos. Por outro lado, *RPL11* não foi associado a nenhuma característica clínico-patológica quando avaliado no tumor como um todo, demonstrando que talvez, sua expressão seja, de fato, mais relevante quando avaliado exclusivamente o componente blastematoso.

## 7. CONCLUSÃO

Embora tenhamos identificado algumas alterações em ambos os genes, elas não são frequentes, sugerindo que, pelo menos considerando *RPL5* e *RPL11*, a via ribossomal parece não ter papel relevante no desenvolvimento do TW. No entanto, considerando que não há estudos sobre o papel desses genes e da via ribossomal em TW, este estudo traz uma nova abordagem nesse contexto.

Todo o trabalho desenvolvido no capítulo 1 está em fase de finalização de escrita de um artigo, que será submetido em breve.

## **8. CAPÍTULO 2 – Análises integradas do metaboloma e do transcriptoma de amostras de tumores de Wilms**

### **8.1. JUSTIFICATIVA**

Os resultados e conclusões gerados pelo objetivo original da proposta de doutorado - apresentados no capítulo 1 - não foram encorajadores no sentido de prosseguir com o estudo. Dessa forma, propusemos caracterizar a metabolômica desses tumores para explorar o impacto das alterações de expressão gênica previamente identificadas em TWs (GUERRA *et al.*, 2019). A metabolômica, associada a outras metodologias, como a transcriptômica, permite identificar de forma indireta, vias biológicas e genes potencialmente envolvidos no desenvolvimento do tumor. Em uma colaboração com o Instituto de Química da UNICAMP, uma avaliação quantitativa de metabólitos identificados em TWs e RNs permitiu identificar diferenças significativas entre as amostras, aumentando ainda mais o interesse sobre a metabolômica desses tumores ((TASIC *et al.*, 2022). De forma indireta, identificar metabólitos alterados entre tecidos tumorais e normais nos permite identificar também, vias alteradas que podem ter impacto direto no desenvolvimento do tumor. Ainda, associar os achados aos dados clínico-patológicos de pacientes pode nos revelar possíveis biomarcadores que podem ter utilidade de prognóstico, diagnóstico, acompanhamento e outras abordagens.

## **9. OBJETIVOS**

### **9.1. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar alterações metabólicas em TWs que possam ser associadas com características clínicas-patológicas de pacientes com TW.

### **9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- A.** Explorar os metabólitos e vias metabólicas identificadas alteradas e sua associação com o desenvolvimento do TW;
- B.** Associar os dados obtidos a partir da análise do metaboloma aos dados clínico-patológicos dos pacientes;
- C.** Realizar uma análise integrada do transcriptoma e do metaboloma para as amostras tumorais e normais, buscando identificar vias, genes e metabólitos potencialmente associados ao desenvolvimento do TW;
- D.** Avaliar o perfil metabolômico de pacientes com TW com foco em metabólitos relacionados à via ribossomal.

## 10. CASUÍSTICA E METODOLOGIA

### 10.1. Seleção de amostras

Para essa metodologia foram aplicados todos os mesmos critérios de inclusão e exclusão de pacientes descritos no subitem 4.2.1, sendo que, para a metodologia de análise do metaboloma, foram usadas apenas amostras congeladas a seco. Todos os 47 casos levantados e selecionados no BNT-INCA para a metodologia descrita no subitem 4.2.3 foram previamente selecionados para esta metodologia. Para as análises experimentais finais, foram selecionados 23 casos que apresentavam amostras pareadas de tecido renal normal (córtex) e tumoral primário, resultando em 46 amostras.

### 10.2. Extração de metabólitos

Esta etapa foi realizada em colaboração com a pesquisadora Dra. Andreia Porcari e os alunos de doutorado Pedro H. Godoy Sanches e Álex Aparecido Rosini Silva, na Universidade São Francisco em Bragança Paulista (SP).

As amostras com peso até 60 mg, foram extraídas por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography*), em uma solução gelada de metanol e água na proporção 4:1. Para otimizar a extração, as amostras foram agitadas por 5 min em um agitador. Além disso, as amostras passaram também por ciclos de congelamento-descongelamento, utilizando nitrogênio líquido para congelá-las, e água em temperatura ambiente para auxiliar no descongelamento, realizando três ciclos por amostra. Essa variação brusca de temperatura ajuda a lisar a célula e facilita a extração. As amostras foram então colocadas em ultrassom por 10 minutos, centrifugadas e secas sob fluxo de nitrogênio gasoso. As amostras foram ressuspensas em 300 µL de outra solução de metanol e água, na proporção 1:1, sendo o volume corrigido em função da massa do tecido inicial. Para evitar variabilidade na ressuspensão, as amostras com massa < 10 mg foram ressuspensas em 165 µL de solvente. Para as demais, o volume foi corrigido em função da massa do tecido seguindo a proporção de 60 mg/mL. Um padrão interno de lisofosfatidilcolina a uma concentração de 10 µg/mL foi adicionado às amostras.

Duas amostras (uma de RN e uma de TW) continham *RNA later*, portanto foram removidas do conjunto de amostras viáveis para análise, uma vez que esse reagente

atuaria com contaminante das amostras, alterando o sinal de leitura no equipamento. Seus respectivos pares foram mantidos para comparações exploratórias das futuras análises estatísticas. Uma amostra de RN foi perdida durante a extração, e, portanto, foi removida. Seu par de tecido tumoral foi mantido para futuras análises estatísticas. Um fluxo de seleção das amostras utilizadas nas análises do metaboloma e a correspondência entre os pares de amostras normais e tumorais estão descritos no **ANEXO 3**.

### **10.3. Análise do perfil metabolômico de amostras de TW pelo método UPLC-MS.**

As amostras foram analisadas pelo método UPLC acoplado à espectrometria de massas (MS, do inglês, *Mass Spectrometry*). Para isso, foram utilizados 200 µL de amostra para as análises através do sistema *ACQUITY UPLC H-Class* (Waters, Milford, Massachusetts, EUA). Foram utilizadas como fase móvel acetonitrila (fase A) e água milli-Q (fase B), ambas com 0,1% de ácido fórmico para auxiliar a ionização. Essa etapa foi realizada com 4 µL/min de volume de injeção, em uma coluna *ACQUITY UPLC® HILIC BHE AMIDE* (2.1 cm x 150 mm x 1.7 µm; Waters) mantida a 45°C. A corrida foi feita em gradiente linear, resultando em 11 minutos de corrida.

A aquisição dos dados foi feita por meio das análises por espectrometria de massas através do espectrômetro *XEVO-G2XS* (Waters) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *Electrospray Ionization*) e analisador híbrido QTOF (do inglês *Quadrupole and Time-of-Flight*). As análises foram feitas tanto no modo positivo de ionização (molécula protonada) quanto negativo (molécula desprotonada).

Para a fonte de ionização, os parâmetros foram ajustados em: (I) modo positivo: tensão do capilar de 3,0 kV, tensão do cone de 40.000, temperatura da fonte em 140°C, temperatura do gás de dessolvatação em 550°C, fluxo de gás de 10 litros/hora e fluxo do gás de dessolvatação de 900 litros/hora; (II) modo negativo: tensão do capilar de 2,0 kV, tensão do cone de 40.000, temperatura da fonte em 140°C, temperatura do gás de dessolvatação em 550°C, fluxo de gás de 50 litros/hora e fluxo do gás de dessolvatação de 900 litros/hora; a faixa de aquisição foi de 50–1700 Da em formato de pico centróide.

Leucina encefalina (MM= 555,62; 200 pg/µl em solução 1:1 acetonitrila: água) foi usada como *Lock Mass*, para medidas de massa com maior acurácia, e uma solução de 0,5 mM de formiato de sódio para calibração do equipamento.

#### 10.4. Interpretação dos dados

Os dados brutos de MS foram processados no software Progenesis Q1 (versão 2.4.69.11, (Nonlinear Dynamics, Newcastle, Reino Unido), que permitiu a seleção, deconvolução e alinhamento de picos. O tratamento dos dados foi realizado em ambiente R (versão 3.6.3) usando a interface RStudio IDE (versão 1.3.1093). O software MetaboAnalyst 5.0 foi usado para as realizar as análises univariadas (teste t de Student e cálculo de fold-change - FC) e multivariadas (Análise de Componentes Principais – PCA; e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais - PLS-DA). Os metabólitos foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: FDR < 0,05; FC > |2| e VIP-score >1 em ambos os componentes 1 e 2 do PLS-DA. Após a seleção dos metabólitos estatisticamente significativos, os mesmos foram utilizados pelo software Progenesis Q1 para sugestão de possíveis identificações por meio de bibliotecas indexadas ao programa, como o HMDB (banco de dados do metaboloma humano, do inglês, *The Human Metabolome Database*) (WISHART *et al.*, 2018) (<https://hmdb.ca/>), LipidMaps (FAHY *et al.*, 2009) (<https://lipidmaps.org/>) e bancos indexados pelo *MassBank of North America* (MoNA, ou banco de dados espectrais de massa da América do Norte; HORAI *et al.*, 2010) (<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>). Foram consideradas tolerância de 5 partes por milhão (ppm) e 10 ppm para íon precursor e fragmento, respectivamente. O enriquecimento de vias metabólicas foi realizado também na plataforma MetaboAnalyst 5.0, utilizando o banco de dado KEGG.

Os modelos de aprendizado de máquina (do inglês, *Machine Learning Models*) foram construídos usando o modelo de máquinas de suporte vetorial (do inglês, *Support Vector Machine* ou SVM). O SVM é um algoritmo de aprendizado supervisionado usado para classificação, regressão e detecção de *outliers*, que analisa os dados e reconhece padrões, cujo objetivo é classificar um determinado conjunto de dados que são mapeados para um espaço de características multidimensional usando uma função kernel, abordagem utilizada para classificar problemas. O SVM propõe a classificação de novos objetos (teste) com base em dados disponíveis (treinamento), ou seja; a partir de um modelo criado, busca prever, para cada nova entrada dada, a qual das possíveis classes a nova entrada faz parte. (DRUCKER *et al.*, 1997)(SARADHI; KARNIK; MITRA, 2005).

Considerando nosso conjunto amostral, o modelo SVM foi construído com 75% dos dados selecionados para o conjunto de treinamento e os 25% restantes para o

conjunto de teste. As propriedades do modelo foram testadas com uma curva de características operacionais do receptor (do inglês, *Receiver Operating Characteristic* ou ROC), para avaliação da Validação Cruzada de Monte-Carlo (do inglês, *Monte-Carlo Cross Validation* ou MCCV). A validação cruzada é uma técnica para avaliar a capacidade de generalização de um modelo, a partir de um conjunto de dados. Esta técnica é amplamente empregada quando o objetivo da modelagem é a predição. Busca-se então estimar o quão preciso é este modelo na prática, ou seja, o seu desempenho para um novo conjunto de dados. (KOHAVI, R, 1995). A ideia desse método é repetir o processo de treinamento/teste diversas vezes. Assim, são feitas diversas simulações para calcular probabilidades de um acerto ou erro. A acurácia preditiva foi avaliada por corridas de permutação dos metabólitos (XU; LIANG, 2004).

Para a interpretação dos dados de metabolômica foram utilizados o PCA e o PLS-DA. O PCA, que é um método não supervisionado, transforma um conjunto original de variáveis em um novo conjunto denominado componentes principais. Essa transformação gera um primeiro componente principal que será responsável pela maior variância do conjunto original de dados, e o segundo componente será responsável pela maior variância restante, e assim sucessivamente – considerando que o número de componentes deva ser, no máximo, igual ao número de variantes analisadas -, sendo que nenhum dos componentes tem relação entre si, e a importância relativa dos componentes decresce do primeiro para o último (HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2016).

A análise de PLS-DA, por ser um método supervisionado, permite realizar a classificação e a seleção de moléculas significativas, entretanto, é necessária a validação do método de classificação. O algoritmo do programa MetaboAnalyst utiliza uma validação cruzada para selecionar os componentes ideais para a classificação dessas moléculas, utilizando a medida denominada importância variável na projeção ou *VIP score* (do inglês, *Variable Importance in Projection*), que é uma soma ponderada dos quadrados dos componentes do PLS. Os pesos são baseados na variância Y explicada em cada dimensão. Quando o número de variáveis a ser avaliado é pequeno, como neste estudo, pode-se usar um ponto de corte  $VIP > 1$  (<https://www.metaboanalyst.ca>). Nesse caso, foram utilizados os componentes 1 e 2 ( $VIP > 1$ ) para a identificação dos metabólitos associados com a diferenciação dos grupos comparados.

### **10.5. Interpretação dos dados de metaboloma e avaliação de metabólitos identificados associados à via ribossomal**

Inicialmente, foram consideradas as diferenças metabólicas entre as amostras tumorais e normais, tanto no modo positivo de ionização quanto no modo negativo. Adicionalmente, foram realizadas ainda, associações entre os resultados iniciais e características clínico-patológicas disponíveis dos pacientes, como recidiva, estadiamento e classificação de risco. As características que apresentaram associação relevante, foram exploradas mais a fundo.

Através das análises de enriquecimento de vias, a partir dos metabólitos identificados pelas análises estatísticas, também foi avaliado se esses metabólitos estavam associados à via ribossomal.

### **10.6. Integração dos dados de transcriptoma e metaboloma**

Todos os genes e metabólitos diferencialmente expressos selecionados da comparação TW vs RN, juntamente com seus respectivos valores de FC, foram usados para a análise das vias integradas através do software MetaboAnalyst 5.0. Utilizamos o *Homo sapiens* como o organismo de referência e o banco de dados KEGG para análise de enriquecimento de vias biológicas integradas. Foram utilizados como parâmetros o “teste hipergeométrico” como algoritmo de análise de enriquecimento e “grau de centralidade” para definir a relação entre as vias. Somente as vias enriquecidas com genes e metabólitos e com  $\text{adjP} < 0,05$  foram consideradas significativas.

## 11. RESULTADOS

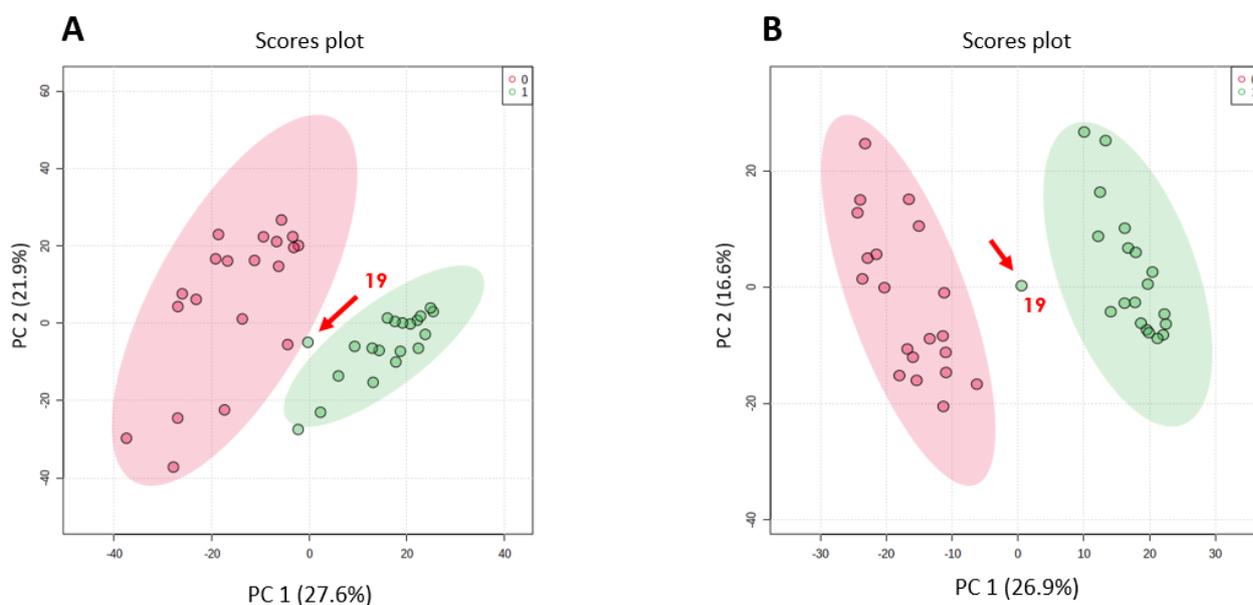
### 11.1. Seleção dos casos

Foram selecionados 23 casos pareados de RN e TW, totalizando 46 amostras. As características clínico-patológicas dos casos estão descritas no **ANEXO 4**.

### 11.2. Avaliação do metaboloma entre as amostras normais e tumorais e associação dos metabólitos à via ribossomal

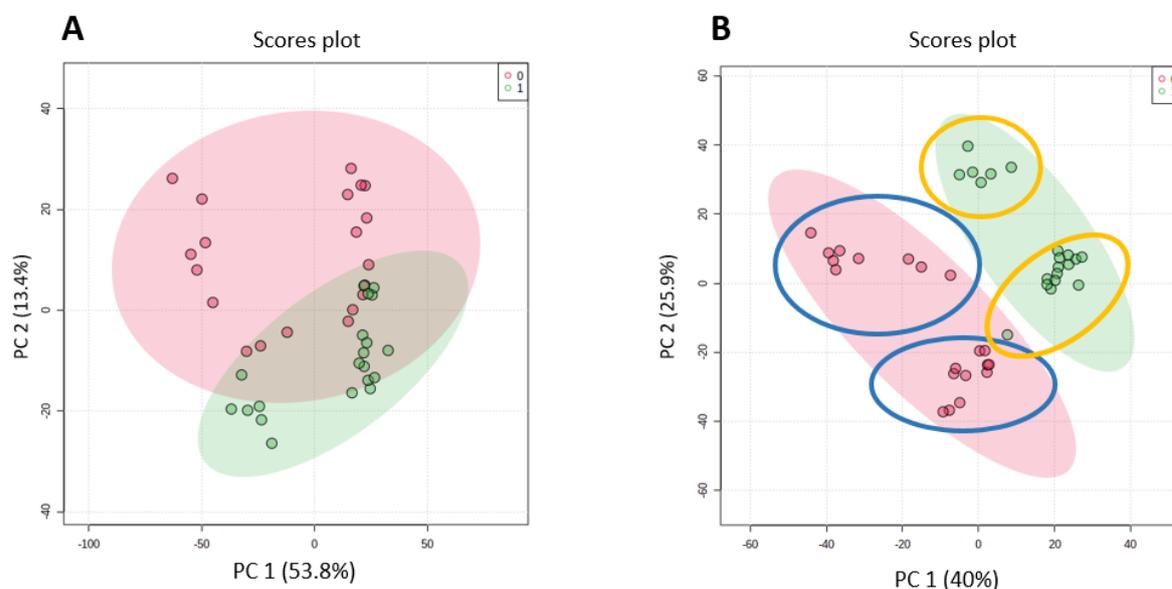
Inicialmente, foram considerados todos os metabólitos identificados entre as amostras tumorais e normais. A diferenciação dos grupos TW e RN foi explorada tanto nos modos de ionização negativa quanto positiva, por análises uni- e multivariadas. Os modos de ionização negativo e positivo, de forma conjunta, recuperaram 223 e 138 *features*, respectivamente. Essa primeira análise foi feita com o intuito de entender a distribuição dos dados e como poderíamos prosseguir com as análises. Dessa forma, optamos por separar as análises por modo de ionização, com o objetivo de refinar os resultados.

Considerando primeiramente o modo negativo de ionização, tanto o PCA quanto o PLS-DA apontaram para diferenças relevantes entre as amostras TW e RN. Ambos demonstraram uma clara separação entre os dois grupos (**Figura 11.1A e B**). Uma amostra (id 19, **anexo 4**) ficou fora da elipse do intervalo de confiança do conjunto de amostras de RN (em verde) tanto no PCA quanto no PLS-DA.



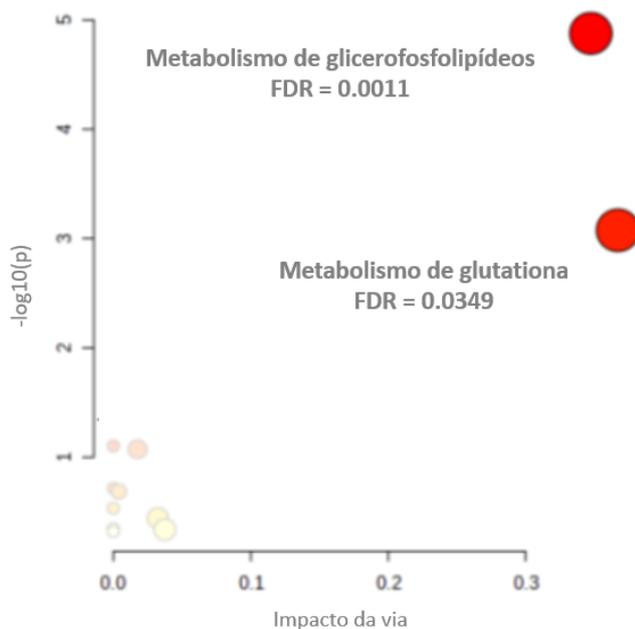
**Figura 11.1. Caracterização da variação do metaboloma em TW e RN através do modo negativo de ionização. A. PCA; B. PLS-DA.** Legenda: em vermelho (0), amostras tumorais; em verde (1), amostras normais.

Resultados semelhantes foram observados para o modo de ionização positiva, sendo que visualmente também observamos a formação de dois subgrupos no PLS-DA (**Figura 11.2A e B**). Dessa forma, buscamos avaliar se alguma característica clínico-patológica poderia estar associada à essa subdivisão. Ao realizarmos essa análise, identificamos que a separação das amostras poderia estar associada à classificação de risco das mesmas.



**Figura 11.2. Caracterização da variação do metaboloma em TW e RN através do modo positivo de ionização. A. PCA; B. PLS-DA** demonstrando a formação de subgrupos, indicados pelas elipses azuis e amarelas. Elipses azuis indicam os subgrupos formados entre as amostras tumorais e as elipses amarelas, os subgrupos formados entre as amostras normais. Legenda: em vermelho (0), amostras tumorais; em verde (1), amostras normais.

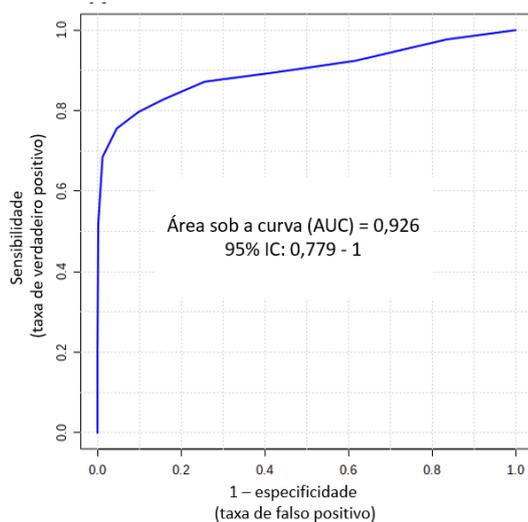
Considerando novamente todos os metabólitos identificados - tanto pelo modo de ionização positiva quanto negativa - foi realizada uma curadoria manual para identificação das moléculas nos bancos de dados. Dos 361 *features* estatisticamente selecionados (223 do modo negativo e 138 do modo positivo), 74 (20%) receberam possíveis identificações pelo software Progenesis QI®. Após a curadoria manual, 46 moléculas estavam indexadas no banco de dados KEGG, e presentes em 11 vias de sinalização celular, sendo duas delas enriquecidas: metabolismo de glicerofosfolípidios (FDR = 0,0011) e de metabolismo de glutathiona (FDR = 0,0349) (**Figura 11.3**).



**Figura 11.3:** Gráfico representativo das vias metabólicas enriquecidas partindo dos metabólitos identificados em ambos os modos, positivo e negativo de ionização, obtidos pelas análises entre TW e RN, através do banco de dados KEGG.

Buscando uma associação entre as vias metabólicas enriquecidas e a via ribossomal, não identificamos nenhuma associação direta, ou ainda, entre os metabólitos pertencentes à tais vias e os genes que integram a via ribossomal.

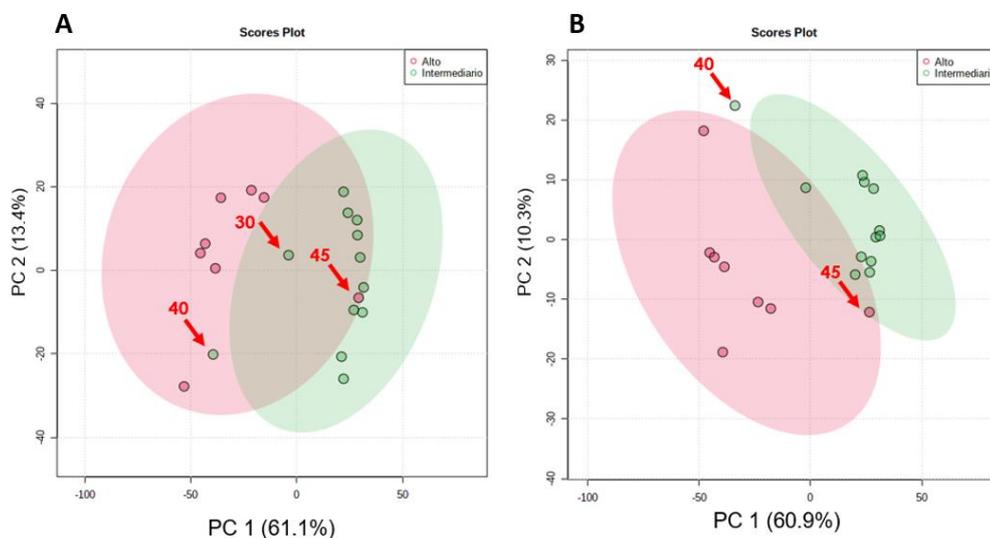
Em busca de uma melhor diferenciação entre as amostras TW e RN, os 46 metabólitos, independente de terem sido indexados, foram usados na construção de um SVM. O modelo SVM previu corretamente 80% das amostras, classificando erroneamente apenas duas amostras de RN como amostras TW (amostras ids 1 e 19, **Anexo 4**). O desempenho do modelo apresentou área sob a curva ROC (AUROC) = 0,926 e IC 95% = 0,779 com base no desempenho médio em todas as simulações de MCCV para o conjunto de treinamento (**Figura 11.4**).



**Figura 11.4:** Modelo de previsão de classificação das amostras de acordo com o tecido de origem com base no conjunto de 46 metabólitos pelas análises entre TW vs RN. Curva ROC mostrando a AUROC e IC 95%, do modelo usado para prever as amostras do conjunto de teste.

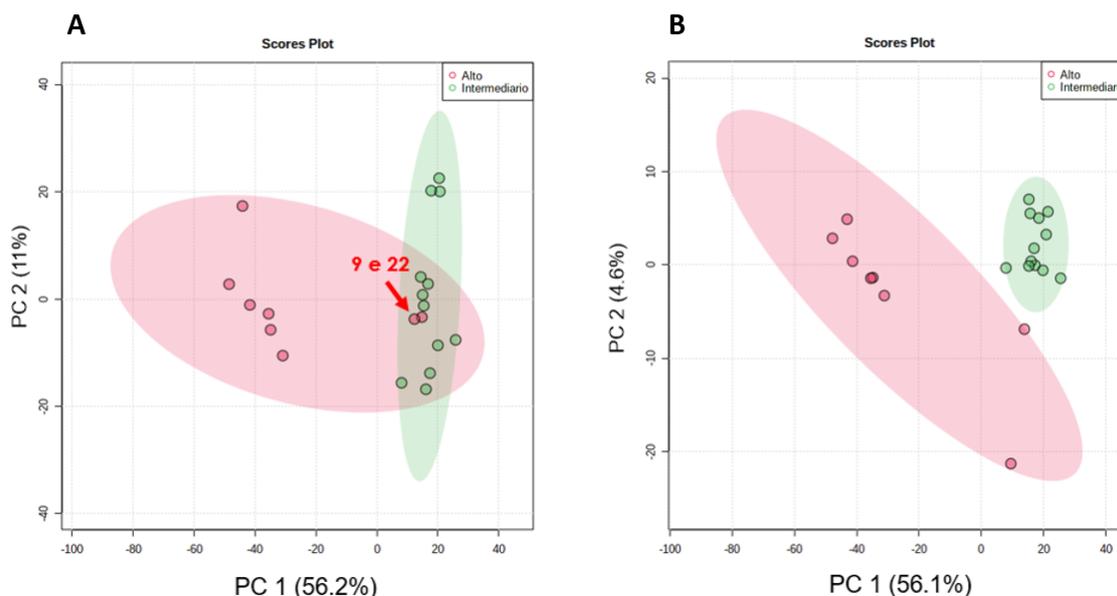
### 11.3. Avaliação do metaboloma com relação à classificação de risco das amostras

Para explorar os subgrupos identificados pelo PLS-DA descrito anteriormente (**Figura 11.2**), as amostras de TW e RN foram analisadas separadamente considerando apenas os metabólitos identificados pelo modo positivo, que demonstrou tal separação. Ambos PCA e PLS-DA confirmaram os achados iniciais. Para as análises considerando somente as amostras tumorais, a maioria das amostras de TW (17 de 20; 85%) foi separada de acordo com a classificação de risco dos casos, com três casos (ids 30, 40 e 45) localizados fora das respectivas elipses (**Figura 11.5 A e B**)



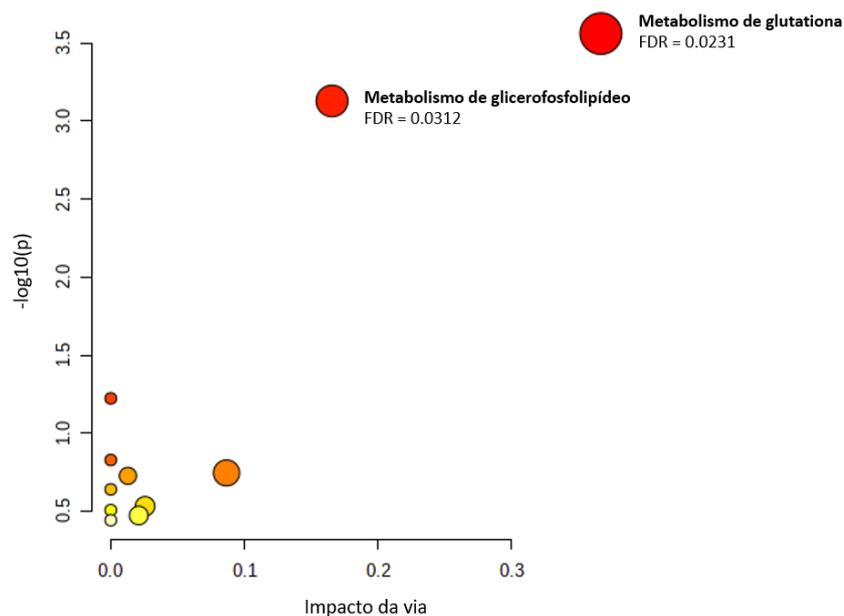
**Figura 11.5: Caracterização da variação do metaboloma entre as amostras tumorais para avaliação da classificação de risco, considerando o modo positivo de ionização. A. PCA; B. PLS-DA. Legenda: em vermelho, amostras de alto risco; em verde, amostras de risco intermediário.**

As mesmas análises foram aplicadas às amostras de RN que também apontaram para uma tendência de segregação entre casos de risco alto e intermediário (18 de 20; 90%), com dois casos (ids 9 e 22) localizados fora das respectivas elipses (**Figura 11.6A e B**).



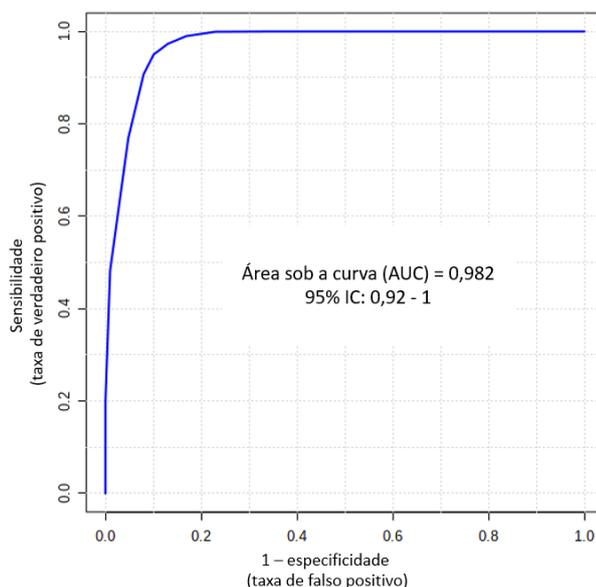
**Figura 11.6: Caracterização da variação do metaboloma entre as amostras normais para avaliação da classificação de risco, considerando o modo positivo de ionização. A. PCA; B. PLS-DA. Legenda: em vermelho, amostras de alto risco; em verde, amostras de risco intermediário**

Considerando novamente todos os metabólitos identificados pelos PLS-DAs - aqueles identificados nas análises do modo positivo de ionização, tanto para as amostras tumorais quanto para as amostras normais - foi realizada uma curadoria manual para identificação nos bancos de dados. Dos 138 *features* estatisticamente selecionados, 32 receberam sugestões de identidade pelo Progenesis Q1. Desses, 22 estavam indexados no banco de dados KEGG, e foram utilizados na análise de enriquecimento de vias. Novamente, a via do metabolismo da glutathiona (FDR= 0,0231) e de glicerofosfolípidios (FDR= 0,0312) foram enriquecidas. (**Figura 11.7**).



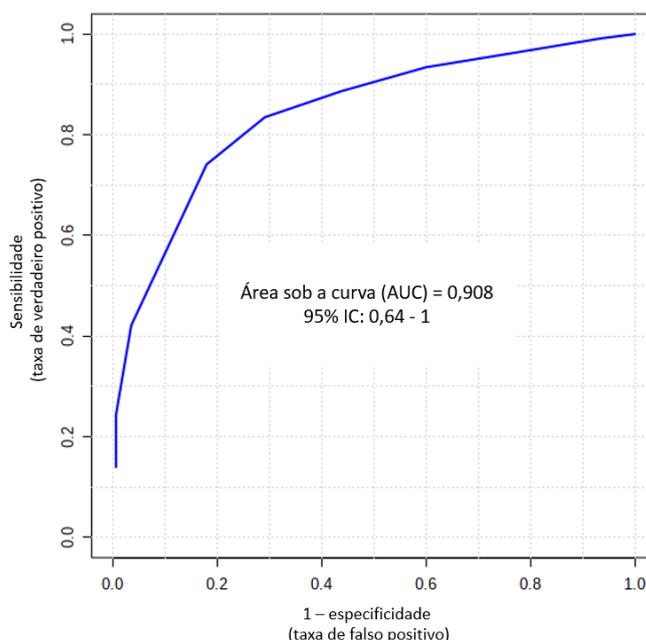
**Figura 11.7:** Gráfico representativo das vias metabólicas enriquecidas partindo dos metabólitos identificados pelo modo positivo de ionização, obtidos pelas análises entre TW e RN considerando os subgrupos formados associados à classificação de risco, através do banco de dados KEGG.

Com base nesses 22 metabólitos identificados, foi construído um modelo SVM para verificar a capacidade desse perfil de metabólitos de classificar as amostras de acordo com a classificação de risco dos pacientes, considerando todas as amostras no conjunto de análise (TW e RN). Esse modelo SVM de classificação de risco apresentou AUROC = 98,2% e IC 95 = 92% ( $p = 5,46 \times 10^{-4}$ ), classificando erroneamente apenas dois casos (ids 19 e 40). Aplicando este modelo nas amostras de teste, foi possível classificar corretamente todas as amostras do conjunto de teste (10/10; 100%) (**Figura 11.8**).



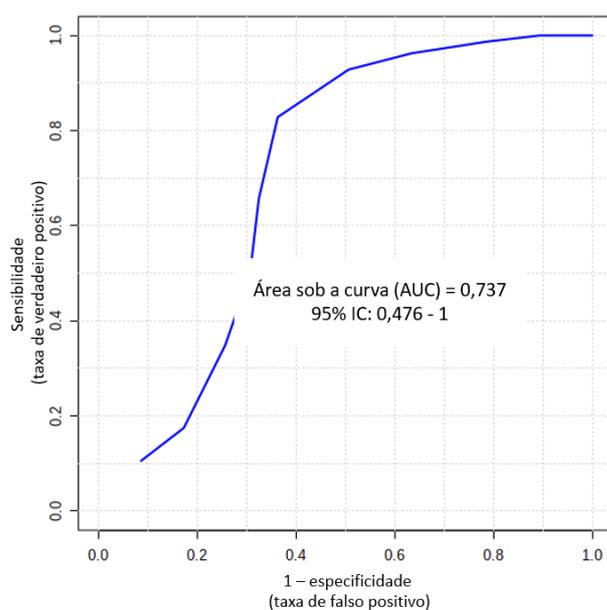
**Figura 11.8:** Modelo de previsão da classificação das amostras de acordo com a classificação de risco com base na resultante do conjunto de 22 metabólitos identificados entre todas as amostras de TW e RN. Curva ROC mostrando a AUROC e IC 95%, do modelo usado para prever as amostras do conjunto de teste.

Ao analisarmos o PLS-DA para as amostras tumorais somente (**Figura 11.5B**), observamos que essas amostras se separam com base na classificação de risco, com exceção das amostras 30, 40 e 45. Por isso, a fim de buscar melhores classificadores para os subgrupos observados no PLS-DA, foi construído também um modelo SVM para avaliar, a partir do mesmo perfil de metabólitos ( $n = 22$ ) utilizados no conjunto de amostras total, a capacidade desse conjunto de metabólitos de classificar as amostras tumorais de acordo com a classificação de risco, de forma independente. Devido à redução do número de amostras totais causada pela divisão das amostras (TW:  $n=20$ ; RN:  $n=20$ ), fazer um conjunto de teste iria reduzir a confiabilidade dos resultados. Portanto, o modelo foi feito com todas as amostras de cada conjunto. Modelos com diferentes variáveis foram criados e gerados por MCCV. O modelo com os melhores parâmetros apresentou AUROC = 90,8% e IC 95 = 64,1%, que são considerados bons parâmetros estatísticos, errando na classificação de apenas 3 das 20 (85%) (ids 30, 40 e 45) amostras do conjunto total (**Figura 11.9**).



**Figura 11.9:** Modelo de previsão da classificação das amostras de acordo com a classificação de risco com base na resultante do conjunto de 22 metabólitos identificados, porém considerando somente as amostras tumorais. Curva ROC mostrando a AUROC e IC 95%, do modelo usado para prever as amostras do conjunto avaliado.

Por outro lado, no conjunto de modelos de predição de classificação de risco utilizando somente amostras normais, o modelo obtido apresentou AUROC = 73,7% e IC 95 = 47,6% (**Figura 11.10**); classificando somente 3 das 20 (85%) amostras de forma errada (ids 8, 9 e 22). Isso indica que, partindo somente das amostras normais, essas podem ser capazes de prever a classificação de risco dos casos de forma independente.



**Figura 11.10:** Modelo de previsão da classificação das amostras de acordo com a classificação de risco com base na resultante do conjunto de 22 metabólitos identificados, porém considerando somente as amostras normais. Curva ROC mostrando a AUROC e IC 95%, do modelo usado para prever as amostras do conjunto avaliado.

Podemos observar que as amostras erroneamente classificadas pelo PLS-DA também foram classificadas incorretamente nos modelos de predição, sugerindo que, talvez, a classificação de risco histopatológica incorreta possa ser a causa do erro de classificação do modelo.

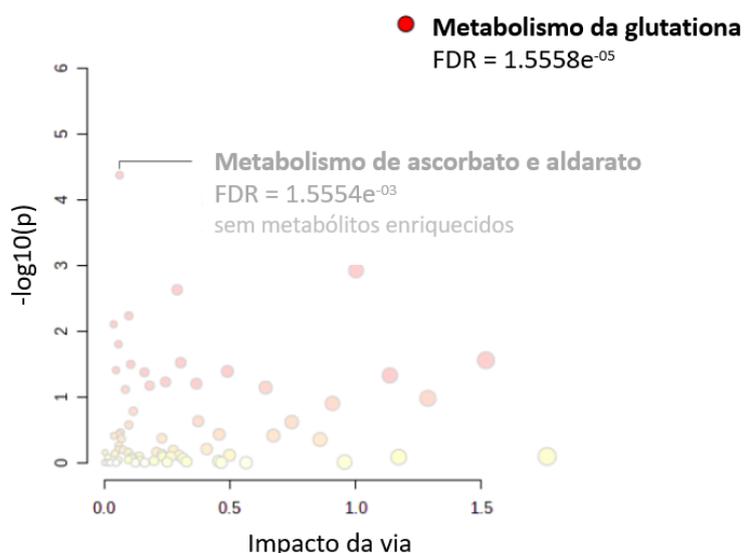
#### 11.4. Análises do transcriptoma

Identificamos 2.569 GDEs entre as amostras TW e RN (FDR <0,001 e lfcThreshold >0,1). As análises de enriquecimento identificaram 39 vias biológicas enriquecidas, sendo 11 com perfil de *down*-regulação e 28 com *up*-regulação no TW em relação ao RN (**Figura 1.6**). Identificamos várias vias metabólicas gerais descritas, como “metabolismo do ácido araquidônico” (9 genes; FDR = 0,0378), “metabolismo de drogas” (13 genes; FDR = 0,0466), “vias metabólicas” (104 genes; FDR = 0,0019)

e “metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450” (10 genes; FDR = 0,0055); todas enriquecidas negativamente no TW em relação ao RN. Essas vias são compostas por genes diretamente relacionados a processos metabólicos celulares, como *GSTA1*, *GSTM5*, *GSTM3*, *GPX3*, *PTGS2*, *PTGS1*, *GGT1*, *GGT5*, *ALOX5* e *PLA2G4F*, que participam do metabolismo da glutathione e glicerofosfolípidios, degradação de espécies reativas de oxigênio e processos inflamatórios. Também identificamos genes que participam da desaminação oxidativa de amins biogênicas e xenobióticas (*MAOA* e *MAOB*) e na biotransformação e conjugação de ácidos graxos e carboxílicos, envolvidos no processo de metabolismo de fármacos (*ACSM2B*, *ACSM2A*, *ACSM5*, *ACSL1*, *ACSS1*), síntese de colesterol, esteróides e outros lipídios (*CYP2C9*, *CYP21A2*, *CYP3A5*, *CYP4A11*) e glicuronidação (*UGT1A6*, *UGT2A3*, *UGT2B7*) entre outros processos celulares energéticos. Todas essas informações foram obtidas do banco de dados KEGG, que descreve as vias e processos biológicos com os quais esses genes estão relacionados.

### 11.5. Integração de dados de transcriptoma e metaboloma

Uma análise integrada realizada através do software MetaboAnalyst, utilizando os 2.569 GDEs e 46 metabólitos previamente identificados entre TW e RN, mostrou que apenas a via do metabolismo da glutathione foi enriquecida (as vias do metabolismo do ascorbato e do aldarato também foram significativamente enriquecidas, porém, como essas vias apresentavam apenas genes como enriquecidos, optamos por não as considerar) (**Figura 11.11**). Foram identificados 4 metabólitos (glutathione, glutathione dissulfeto, NADPH - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo, do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* - e Cisteinilglicina) e 17 genes (*ANPEP*, *GGT1*, *GGT5*, *GPX3*, *GPX7*, *GPX8*, *GSS*, *OPLAH*, *NAT8*, *GSTA1*, *GSTM3*, *GSTM4*, *GSTM5*, *GSTK1*, *ODC1*, *RRM1*, *RRM2*) (FDR =  $1,5558 \times 10^{-5}$ ) (**ANEXO 5**) relacionados à via. Esses dados sugerem que esses compostos e genes podem ser relevantes para os processos relacionados ao desenvolvimento do TW.



**Figura 11.11:** Gráfico representativo das vias metabólicas enriquecidas partindo da integração dos dados de transcriptoma e de metaboloma entre amostras de TW e RN, através do banco de dados KEGG.

Alguns desses genes foram identificados enriquecidos em algumas vias na análise isolada do transcriptoma, descrita anteriormente, como *GSTA1*, *GSTM3*, *GSTM5* nas vias de metabolismo de drogas e de metabolismo de xenobióticos pelo citocromo P450; *GGT1*, *GGT5*, *GPX3*, *ANPEP* e *OPLAH* na via de metabolismo do ácido araquidônico e na via de metabolismo geral. Verificamos também que a maioria dos genes enriquecidos na análise integrada, participam diretamente do metabolismo da glutathiona (*GGT1*, *GGT5*, *GPX3*, *GPX7*, *GPX8*, *GSS*, *GSTA1*, *GSTM3*, *GSTM4*, *GSTM5*, *GSTK1*) que é uma via descrita relacionada ao contexto do câncer, o que também pode ser relevante para o contexto do TW. *NAT8*, *RRM1*, *RRM2* e *ODC1* ainda são pouco explorados de forma geral, com raros estudos no contexto do câncer em geral e sem estudos sobre tumores pediátricos.

## 12. DISCUSSÃO

A reprogramação metabólica de tumores é uma das “novas marcas” do câncer e apresenta íntima relação com alterações epigenéticas e imunológicas (PAVLOVA; THOMPSON, 2016). Nos últimos anos, a metabolômica surgiu como alvo de estudo com foco principal na descoberta de novos biomarcadores, e geralmente, sendo associada a outras metodologias, como genômica e transcriptômica. Esses biomarcadores são explorados principalmente pela identificação dessas moléculas tanto em tecidos quanto por meio de biofluidos humanos, o que é conhecido como biópsia líquida, por ser um método não invasivo e de mais fácil acesso ao material biológico para análises moleculares (TRIVEDI; HOLLYWOOD; GOODACRE, 2017).

Nesse sentido, realizamos um estudo abrangente, com foco em explorar o metaboloma do TW e as alterações entre os tecidos tumoral e normal, bem como explorar de forma integrada, dados de transcriptoma e metaboloma a fim de identificar possíveis vias, genes e metabólitos que possam estar alterados entre essas condições e, portanto, associados ao desenvolvimento do TW.

Na literatura, identificamos alguns estudos sobre alterações metabólicas relacionadas à tumorigênese e características clínico-patológicas do TW. O metabolismo energético mitocondrial de TW apresentou perfis específicos ao avaliar os subtipos histológicos (KOFLER, 2011). Os níveis de metabólitos urinários mostraram que níveis de metabólitos específicos estavam diminuídos em tumores de diferentes estágios e histologia em comparação com controles, sugerindo que o perfil metabólico identificado na urina dos pacientes pode ser útil como um marcador de estadiamento, histologia e recidiva (MACLELLAN *et al.*, 2014). Um estudo recente do qual nosso grupo participou identificou 16 metabólitos diferencialmente produzidos entre TW e RN, sendo 13 com concentrações aumentadas e 3 com concentrações diminuídas nos TW em relação ao RN. Os níveis de aminoácidos de cadeia ramificada estavam diminuídos no TW, enquanto lipídios, lactato e glutamina/glutamato apresentaram níveis aumentados. Esses 16 metabólitos indicam alterações no metabolismo de glicólise, glutaminólise, no ciclo de TCA (ácido tricarboxílico) e de lipídios e aminoácidos em TW (TASIC *et al.*, 2022). De uma forma geral, ainda são raros os estudos que exploram alterações metabólicas em TWs e, portanto, ainda há uma lacuna a ser preenchida sobre o impacto dessas alterações e suas interações

com outros mecanismos moleculares que possam estar associadas ao desenvolvimento do TW.

Em nosso estudo, exploramos as alterações metabólicas por meio da técnica de metabolômica baseada em espectrometria de massas e, inicialmente, avaliamos a associação entre os metabólitos identificados à via ribossomal, explorada no capítulo 1 desta tese.

As alterações metabólicas associadas aos defeitos na via ribossomal também contribuem para o potencial oncogênico das RPs. O estresse oxidativo e outras alterações metabólicas exacerbam o estresse ribossomal e induzem danos ao DNA, promovendo mutações secundárias e instabilidade genômica (KANG *et al.*, 2021). Embora essas associações sejam recentes e não tenham sido relacionadas diretamente a *RPL5* e *RPL11*, um outro gene da via, *RPL10*, foi associado a tais alterações. A mutação *RPL10-R98S* em pacientes com LLA-T foi associada ao estresse oxidativo, que potencialmente aumenta a instabilidade genômica e a transformação oncogênica (SULIMA *et al.*, 2019). Portanto, buscar identificar alterações metabólicas que possam estar associadas à via ribossomal e a *RPL5* e *RPL11* foi também um objetivo do nosso estudo. No entanto, não identificamos nenhuma associação inicial entre os dados do metaboloma e a via, reforçando que essa via provavelmente não contribui para o desenvolvimento ou progressão do TW.

Em seguida, avaliamos o metaboloma entre os tecidos tumoral e normal por outra perspectiva, isolando as análises pelos modos de ionização e identificamos diferenças significativas entre TW e RN pelo modo negativo, por meio das quais foi possível observar uma clara separação entre os grupos, com alta acurácia. Através de uma avaliação cuidadosa, identificamos 46 moléculas potenciais, que podem ser capazes de distinguir e classificar os tecidos de acordo com sua origem. Para verificar se, de fato, essas moléculas seriam capazes de prever a classificação das amostras (TW ou RN) apenas com base no perfil desses metabólitos, foi realizado um modelo de predição SVM, conseguindo com uma AUROC = 0,926 e 95 % IC = 0,775, classificar corretamente 80% das amostras no conjunto de teste. De acordo com a análise de enriquecimento das vias a partir dos dados do PLS-DA, o metabolismo lipídico seria importante para as células do TW, uma vez que essas moléculas estão envolvidas nas vias do metabolismo de glicerofosfolipídios e glutatona, que foram as vias biológicas enriquecidas a partir desses 46 metabólitos selecionados. O metabolismo lipídico desregulado é amplamente discutido na literatura associado a

mecanismos relacionados ao câncer. Essas moléculas desempenham diversos papéis no metabolismo celular e, devido à sua variedade e complexidade, são capazes de participar de diferentes vias concomitantemente, permitindo uma ampla gama de possibilidades de adaptação pelas células tumorais, uma vez estabelecida a reprogramação metabólica (BELORIBI-DJEFAFLIA; VASSEUR; GUILLAUMOND, 2016).

A ferroptose é uma forma de morte celular programada que se caracteriza pelo acúmulo de peróxidos lipídicos letais ferro-dependentes. Possivelmente as alterações no metabolismo lipídico durante a ferroptose podem estar associadas a alterações relacionadas ao câncer, como iniciação e desenvolvimento tumoral, desenvolvimento de metástases e resistência ao tratamento (LI; LI, 2020). Essas descobertas ainda são recentes e podem ser mais relevantes para alguns tipos de tumores, o que justifica uma melhor e mais aprofundada abordagem desse tema em estudos futuros, incluindo para os TWs, uma vez que nosso estudo identificou que, possivelmente, o metabolismo lipídico possa ter um papel relevante para o seu desenvolvimento.

Ainda, nas análises entre TW e RN, no modo de ionização positiva, observamos a formação de subgrupos dentro de cada conjunto amostral. Buscando identificar alguma característica clínico-patológicas que pudesse explicar essa segregação, identificamos uma associação entre os subgrupos formados e a classificação de risco dessas amostras. Portanto, realizamos análises supervisionadas e não supervisionadas que mostraram uma clara segregação de grupos de risco intermediário e alto nas análises de PLS-DA, tanto quando avaliadas somente as amostras tumorais quando somente as amostras normais, sugerindo que o perfil metabólico analisado poderia prever de forma independente a classificação de risco dos pacientes. Considerando as moléculas responsáveis por essa classificação, observamos que elas estão relacionadas à via do metabolismo dos glicerofosfolípidios, também identificada nas análises entre os tecidos tumoral e normal anteriormente descritas; reforçando mais uma vez, que o metabolismo lipídico pode ter um papel importante para o desenvolvimento do TW e pode ainda, estar associado à progressão tumoral.

Como mencionado anteriormente, a metabolômica tem sido utilizada em associação com outras metodologias como forma de buscar uma compreensão mais ampla da biologia tumoral. Assim, nosso estudo também buscou integrar dados de transcriptoma e metaboloma das amostras de TW e RN, visando explorar novos

mecanismos biológicos que possam estar envolvidos no desenvolvimento do TW, bem como explorar outros potenciais biomarcadores tanto focando em genes quanto em novos metabólitos a serem identificados. Nesse sentido, através da integração de dados, identificamos a via do metabolismo da glutathione como enriquecida, com 17 genes e 4 metabólitos que integram a via, o que nos leva a acreditar que esses genes e metabólitos podem ter um papel relevante no desenvolvimento tumoral e devem ser mais explorados. Embora esta via seja conhecida por seus efeitos antioxidantes (MATÉS *et al.*, 2020) e como eles podem ser um mecanismo protetor contra a peroxidação lipídica, estresse oxidativo, proteção contra xenobióticos e vários outros processos fisiológicos (CORSO; ACCO, 2018) (KENNEDY *et al.*, 2020), sua desregulação pode levar à diminuição da sensibilidade à quimioterapia e radioterapia, levando à resistência ao tratamento (BANSAL; SIMON, 2018)(DESIDERI; CICCARONE; CIRIOLO, 2019). Os quatro metabólitos identificados: glutathione, glutathione dissulfeto, NADPH e cisteinilglicina, participam do metabolismo de lipídeos, mas também desempenham outros papéis que podem ser associados ao câncer.

Foi descrito um possível papel da glutathione como modificador pós-traducional de histonas, alterando a estrutura do nucleossomo. Evidências indicam a hipótese de que existe uma ligação entre o metabolismo de glutathione e o controle de mecanismos epigenéticos em diferentes níveis (como a metilação de DNA, mudanças na expressão de miRNAs e alterações de histonas) (GARCÍA-GIMÉNEZ *et al.*, 2017). NADPH participa também de processos de regulação do estresse oxidativo celular. Durante a progressão, as células tumorais se adaptam ao estresse oxidativo aumentando os níveis de NADPH de várias maneiras, incluindo a ativação de AMPK (Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina, do inglês *AMP-activated protein kinase*), pentoses fosfato e do metabolismo redutor de glutamina e folato (HAYES; DINKOVA-KOSTOVA; TEW, 2020). Além disso, em tumores com mutação em *IDH1/2*, o NADPH serve como cofator para gerar hidroxiglutarato D-2, um oncometabólito. A necessidade das células tumorais de níveis elevados de NADPH oferece uma oportunidade para direcionar sua síntese para o tratamento do câncer (JU *et al.*, 2020)(RATHER *et al.*, 2021). Já a cisteinilglicina ainda é pouco explorada de forma isolada no contexto do câncer, sendo apresentada, geralmente, em estudos associados à glutathione. No entanto, um estudo recente identificou que este metabólito tem sítios de ligação importantes ao gene *GGT1* ligado à glutathione; sendo que este gene é associado a uma série de doenças, dentre as quais o câncer (TERZYAN *et al.*,

2021), e foi um dos genes identificados nas nossas análises de integração. Os genes da família da gama-glutamyltransferases (GGTs) são descritos associados a diversos tipos de câncer como adenocarcinoma de pulmão (WEI; DONG; LI, 2020), ovário (GRIMM *et al.*, 2013) e endométrio (SEEBACHER *et al.*, 2012). *GGT5* foi associado ao aumento de risco de desenvolver determinados tipos de câncer como os gastrointestinais (esôfago, estômago e colorretal) em um grande estudo de base populacional realizado na Coreia (HONG *et al.*, 2021). Ambos *GGT1* e *GGT5* participam diretamente do metabolismo de glutathione (BACHHAWAT; YADAV, 2018).

*ANPEP* (também conhecido como *CD13*) é uma forma de peptídeo amplamente explorada no contexto do câncer, relacionada ao potencial proliferativo, angiogênico, apoptótico e metastático tumoral (MINA-OSORIO, 2008), já explorado em diferentes tipos de tumores como no câncer gástrico, pancreático e de vesícula biliar (HASHIDA *et al.*, 2002)(IKEDA *et al.*, 2003)(LIU, ZIRU *et al.*, 2020); além de ter sido descrito relacionado ao desenvolvimento de resistência ao tratamento (GUO *et al.*, 2020). Os genes da família GPX (glutathione peroxidase) identificados pela integração dos dados incluem *GPX3*, *GPX7* e *GPX8*, e atuam também no processo de ferroptose e peroxidação lipídica, associados a processos inflamatórios relacionados à carcinogênese (CAO; DIXON, 2016)(BRIGELIUS-FLOHÉ; FLOHÉ, 2020). Genes da superfamília da glutathione-S-transferase (GST) incluem os genes das sub-famílias GSTM, GSTA e GSTK, às quais pertencem os genes *GSTM3*, *GSTM4* e *GSTM5*; *GSTA1* e *GSTK1* respectivamente; que foram identificados nas nossas análises. Esses genes, de forma geral, participam de certos processos celulares vitais, bem como atuam em mecanismos de detoxificação, por meio da conjugação da glutathione reduzida com diversos substratos, como fármacos e poluentes ambientais. Esses são regulados positivamente em resposta ao estresse oxidativo e apresentam-se super-expressos em muitos tumores, estando associados à resistência ao tratamento (NEBERT; VASILIOU, 2004). Polimorfismos em genes dessa superfamília também são descritos, inclusive em tumores pediátricos, porém as associações de risco foram realizadas em populações muito específicas, e necessitam ser mais exploradas, assim como as possíveis abordagens terapêuticas que exploram tais genes (LUO *et al.*, 2011). *NAT8* é expresso especificamente no rim e no fígado e pode ter um papel importante a ser explorado (*The Human Protein Atlas*) uma vez que não foram identificados estudos que explorem esse gene de forma específica em câncer. *RRM1* e *RRM2* (genes da família ribonucleotídeo redutase) atuam na replicação do

DNA durante a fase S do ciclo celular, bem como em múltiplos processos de reparo do DNA (JOHANSSON, RENZO *et al.*, 2016). *RRM1* foi descrito relacionado à resistência ao tratamento com gemcitabina em tumores pancreáticos (KATO *et al.*, 2021), e sua baixa expressão foi associada a uma melhor sobrevida livre de progressão em pacientes tratados também com gemcitabina, porém com câncer de bexiga (YANG *et al.*, 2019). Alta expressão de *RRM2* foi associada ao maior potencial metastático de células de câncer de mama através da via de sinalização PI3K/AKT, porém são dados de estudos *in vitro* (ZHUANG *et al.*, 2020). O *knockdown* de *RRM2* inibiu sua função oncogênica em células de câncer de próstata, enquanto sua super-expressão promoveu a transição mesênquima-epitélio, também *in vitro* (MAZZU *et al.*, 2019). *ODC1* ainda é um gene pouco explorado no contexto do câncer, embora tenha sido descrito um possível papel no desenvolvimento de resistência a drogas (ZHU *et al.*, 2022).

Apesar da alta precisão e dos bons índices de predição, algumas amostras não foram classificadas corretamente em nosso modelo. Podemos supor que a atual classificação patológica pode ser um fator importante a ser considerado para essa classificação errônea, pois a estratificação de risco é baseada em um percentual de células calculado pelo patologista ao observar um número limitado de lâminas de HE. O limite para determinar essa porcentagem é muito subjetivo, e um tumor classificado com 66% de blastema e, portanto, de alto risco, é tratado de forma diferente de um tumor com 60% de blastema, por exemplo, classificado como de risco intermediário, com base apenas em uma porcentagem estimada do subtipo histológico (DOME *et al.*, 2014). O treinamento e experiência do patologista é de extrema importância para a confiabilidade dessa classificação, o que, ainda assim, não garante que não ocorram erros. Essa subjetividade é amplamente discutida entre grupos internacionais e, de fato, é um fator que pode levar à classificação errônea de alguns tumores. Essa classificação vem sendo revista em um estudo clínico internacional denominado UMBRELLA, que propõe uma revisão patológica central dos casos, associada a exames de imagem para melhorar a classificação de risco dos pacientes (VUJANIĆ *et al.*, 2018). Ainda assim, biomarcadores que auxiliem nessa estratificação seriam extremamente úteis para aumentar a acurácia dessa classificação e, conseqüentemente, impactar diretamente no tratamento desses pacientes, evitando o super tratamento em casos de risco baixo e intermediário, assim como intensificar o

tratamento nos casos mais agressivos, como os de alto risco; evitando também os efeitos tardios colaterais provocados pelo tratamento.

Nossos dados sugerem que, partindo apenas do tecido normal, o perfil de metabólitos selecionados (n = 22) seria capaz de prever a classificação de risco de forma independente, com acurácia de 75,4%, classificando erroneamente somente 3 das 20 (85%) amostras avaliadas. No entanto, partindo-se também somente do tecido tumoral, essa capacidade de predição se repete, com 80% de acurácia na predição, errando na classificação de apenas 3 das 20 (85%) amostras avaliadas, o que é um outro ponto positivo e relevante do nosso estudo. Um maior número de casos deve ser analisado relativo à metabolômica juntamente com revisão patológica para melhor avaliar amostras que são erroneamente classificadas.

Apesar desses dados interessantes, ainda seria necessário expandir o conjunto amostral para validar nossos achados e, assim, explorar sua possível utilidade no futuro. Porém, nossos resultados se tornam promissores a uma futura e mais aprofundada investigação.

Os resultados das análises apresentadas neste capítulo 2 estão em fase de finalização de escrita de um artigo, que será submetido para publicação em breve.

### 13. CONCLUSÕES

- Identificamos diferenças significativas nos níveis de metabólitos entre TW e RN, a partir das quais foi possível identificar um conjunto de metabólitos capazes de classificar as amostras de acordo com o tecido de origem;
- Observamos que a formação de subgrupos dentro de cada conjunto de amostras foi associada à classificação de risco dos casos avaliados, abrindo a possibilidade de explorarmos o perfil de metabólitos como biomarcador, associado à avaliação patológica, com o objetivo de melhorar a classificação dos pacientes em grupos de risco e assim, direcionar melhor o tratamento;
- Todos os modelos de predição apresentaram bons parâmetros estatísticos, conferindo uma alta confiabilidade em uma possível utilização futura dessas moléculas como biomarcadores para auxiliar na classificação de risco de pacientes com TW, que é um grande desafio a ser superado atualmente nesse tipo de tumor;
- Apesar dos bons e interessantes resultados são necessárias abordagens em um conjunto maior de amostras de forma a corroborar nossos achados e tornar o método mais robusto;
- Apesar de não identificarmos associação direta entre as vias metabólicas enriquecidas e os metabólitos a elas associadas e a via ribossomal, isso não significa que não hajam outros metabólitos e vias metabólicas que possam ter relação com essa via, em relação ao TW.

#### 14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-GHABKARI, Abdulhameed; NARENDRAN, Aru. *In Vitro* Characterization of a Potent p53-MDM2 Inhibitor, RG7112 in Neuroblastoma Cancer Cell Lines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, v. 34, n. 4, maio 2019.
- AL-HUSSAIN, Turki; ALI, Afshan; AKHTAR, Mohammed. Wilms Tumor. *Advances in Anatomic Pathology*, v. 21, n. 3, maio 2014.
- ALEXANDRESCU, Sanda *et al.* Clinical, Pathologic, and Genetic Features of Wilms Tumors With *WTX* Gene Mutation. *Pediatric and Developmental Pathology*, v. 20, n. 2, 26 abr. 2017.
- AMSTERDAM, Adam *et al.* Many Ribosomal Protein Genes Are Cancer Genes in Zebrafish. *PLoS Biology*, v. 2, n. 5, 11 maio 2004.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, v. 31, n. 2, 15 jan. 2015.
- ANDERSON, Stephen J. *et al.* Ablation of Ribosomal Protein L22 Selectively Impairs  $\alpha\beta$  T Cell Development by Activation of a p53-Dependent Checkpoint. *Immunity*, v. 26, n. 6, jun. 2007.
- ANSELMI, Laura *et al.* Insights on the Interplay between Cells Metabolism and Signaling: A Therapeutic Perspective in Pediatric Acute Leukemias. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 17, 28 ago. 2020.
- ARBIV, O.A. *et al.* Molecular analysis and genotype-phenotype correlation of Diamond-Blackfan anemia. *Clinical Genetics*, v. 93, n. 2, fev. 2018.
- ARDELJAN, Daniel *et al.* The Human Long Interspersed Element-1 Retrotransposon: An Emerging Biomarker of Neoplasia. *Clinical Chemistry*, v. 63, n. 4, 1 abr. 2017.
- ARMITAGE, Emily G.; BARBAS, Coral. Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 87, jan. 2014.
- ARNOLD, Michael A. *et al.* Diagnostic Pitfalls of Differentiating Desmoplastic Small Round Cell Tumor (DSRCT) From Wilms Tumor (WT). *American Journal of Surgical Pathology*, v. 38, n. 9, set. 2014.
- ARVA, Nicoleta C. *et al.* Diagnostic Utility of Pax8, Pax2, and NGFR Immunohistochemical Expression in Pediatric Renal Tumors. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v. 26, n. 10, nov. 2018.
- ASTUTI, Dewi *et al.* Germline mutations in *DIS3L2* cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility. *Nature Genetics*, 2012.

AUBREY, Brandon J.; STRASSER, Andreas; KELLY, Gemma L. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 6, n. 5, 2 maio 2016.

AUWERA, Geraldine A. *et al.* From FastQ Data to High- Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 43, n. 1, 15 out. 2013.

BACHHAWAT, Anand Kumar; YADAV, Shambhu. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the  $\gamma$ -glutamyl cycle. *IUBMB Life*, v. 70, n. 7, p. 585–592, jul. 2018.

BANSAL, Ankita; SIMON, M. Celeste. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology*, v. 217, n. 7, p. 2291–2298, 2 jul. 2018.

BARBIERI, Eveline *et al.* A p53 Drug Response Signature Identifies Prognostic Genes in High-Risk Neuroblastoma. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, 19 nov. 2013.

BARCHITTA, Martina *et al.* LINE-1 Hypomethylation in Blood and Tissue Samples as an Epigenetic Marker for Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 2 out. 2014.

BARDEESY, Nabeel *et al.* Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nature Genetics*, v. 7, n. 1, maio 1994.

BAYLIN, Stephen B.; JONES, Peter A. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, v. 11, n. 10, 23 out. 2011.

BECKWITH, J. B.; PALMER, N. F. Histopathology and prognosis of Wilms tumor Results from the first national wilms' tumor study. *Cancer*, v. 41, n. 5, maio 1978.

BECKWITH, J. Bruce *et al.* Histological analysis of aggressiveness and responsiveness in Wilms' tumor. *Medical and Pediatric Oncology*, v. 27, n. 5, nov. 1996.

BECKWITH, J. Bruce; KIVIAT, Nancy B.; BONADIO, Jeffrey F. Nephrogenic Rests, Nephroblastomatosis, and the Pathogenesis of Wilms' Tumor. *Pediatric Pathology*, v. 10, n. 1–2, 9 jan. 1990.

BELORIBI-DJEFAFLIA, S; VASSEUR, S; GUILLAUMOND, F. Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis*, v. 5, n. 1, p. e189–e189, 25 jan. 2016.

BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, v. 57, n. 1, jan. 1995.

BJORNSSON, Hans T. *et al.* Epigenetic Specificity of Loss of Imprinting of the IGF2 Gene in Wilms Tumors. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, n. 16, 15 ago. 2007.

BLOMBERY, Piers *et al.* Frequent activating STAT3 mutations and novel recurrent genomic abnormalities detected in breast implant-associated anaplastic large cell lymphoma. *Oncotarget*, v. 9, n. 90, 16 nov. 2018.

BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, v. 30, n. 15, 1 ago. 2014.

BONADIO, J F *et al.* Anaplastic Wilms' tumor: clinical and pathologic studies. *Journal of Clinical Oncology*, v. 3, n. 4, abr. 1985.

BOON, Kathy *et al.* N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *The EMBO Journal*, v. 20, n. 6, 15 mar. 2001.

BORIA, Ilenia *et al.* The ribosomal basis of diamond-blackfan anemia: mutation and database update. *Human Mutation*, v. 31, n. 12, dez. 2010.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, maio 1976.

BRESLOW, Norman *et al.* Familial Wilms' tumor: A descriptive study. *Medical and Pediatric Oncology*, v. 27, n. 5, nov. 1996.

BRESLOW, Norman E. *et al.* Age distributions, birth weights, nephrogenic rests, and heterogeneity in the pathogenesis of Wilms tumor. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 47, n. 3, set. 2006.

BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina; FLOHÉ, Leopold. Regulatory Phenomena in the Glutathione Peroxidase Superfamily. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 33, n. 7, p. 498–516, 1 set. 2020.

BROK, Jesper *et al.* Biology and treatment of renal tumours in childhood. *European Journal of Cancer*, v. 68, nov. 2016.

BROK, Jesper *et al.* Relapse of Wilms' tumour and detection methods: a retrospective analysis of the 2001 Renal Tumour Study Group–International Society of Paediatric Oncology Wilms' tumour protocol database. *The Lancet Oncology*, v. 19, n. 8, ago. 2018.

CALL, Katherine M. *et al.* Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, v. 60, n. 3, fev. 1990.

CANGEMI, Giuliana *et al.* Interchangeability between 24-hour collection and single spot urines for vanillylmandelic and homovanillic acid levels in the diagnosis of neuroblastoma. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 60, n. 12, dez. 2013.

CAO, Jennifer Yinuo; DIXON, Scott J. Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, n. 11–12, p. 2195–2209, 5 jun. 2016.

CAPASSO, Mario *et al.* Genetic Predisposition to Solid Pediatric Cancers. *Frontiers in Oncology*, v. 10, 28 out. 2020.

CARVALHO DE OLIVEIRA, Jaqueline *et al.* MiRNA Dysregulation in Childhood Hematological Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 9, 10 set. 2018.

CHAGTAI, Tasnim *et al.* Gain of 1q As a Prognostic Biomarker in Wilms Tumors (WTs) Treated With Preoperative Chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 Trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 34, n. 26, 10 set. 2016.

CHALLAGUNDLA, K. B. *et al.* Ribosomal Protein L11 Recruits miR-24/miRISC To Repress c-Myc Expression in Response to Ribosomal Stress. *Molecular and Cellular Biology*, v. 31, n. 19, 1 out. 2011.

CHANG, H. *et al.* Wt1 negatively regulates  $\beta$ -catenin signaling during testis development. *Development*, v. 135, n. 10, 9 abr. 2008.

CHARLES; VUJANIĆ; BERRY. Renal tumours of childhood. *Histopathology*, v. 32, n. 4, 25 abr. 1998.

CHARLTON, Jocelyn *et al.* Comparative methylome analysis identifies new tumour subtypes and biomarkers for transformation of nephrogenic rests into Wilms tumour. *Genome Medicine*, 2015.

CHARLTON, Jocelyn *et al.* Methylome analysis identifies a Wilms tumor epigenetic biomarker detectable in blood. *Genome Biology*, v. 15, n. 8, 19 ago. 2014.

CHARLTON, Jocelyn; PRITCHARD-JONES, Kathy. WT1 Mutation in Childhood Cancer. [S.l: s.n.], 2016. .

CHEN, D *et al.* Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53–MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene*, v. 26, n. 35, 19 ago. 2007.

CICERI, Sara *et al.* Analysis of the mutational status of SIX1/2 and microRNA processing genes in paired primary and relapsed Wilms tumors and association with relapse. *Cancer Gene Therapy*, 6 dez. 2020.

CLAUDINO, Wederson Marcos *et al.* Metabolomics: Available Results, Current Research Projects in Breast Cancer, and Future Applications. *Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 19, 1 jul. 2007.

COORENS, Tim H. H. *et al.* Embryonal precursors of Wilms tumor. *Science*, v. 366, n. 6470, 6 dez. 2019.

CORBIN, Marie *et al.* WNT/ $\beta$ -catenin pathway activation in Wilms tumors: A unifying mechanism with multiple entries? *Genes, Chromosomes and Cancer*, v. 48, n. 9, set. 2009.

CORSO, Claudia Rita; ACCO, Alexandra. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 128, p. 43–57, ago. 2018.

CRICK, FRANCIS. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*, v. 227, n. 5258, ago. 1970.

CROCE, Carlo M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 10, out. 2009.

DA COSTA, Lydie *et al.* Ribosomal protein S19 expression during erythroid differentiation. *Blood*, v. 101, n. 1, 1 jan. 2003.

DAI, Mu-Shui *et al.* Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *The EMBO Journal*, v. 26, n. 14, 25 jul. 2007.

DAI, Mu-Shui *et al.* Ribosomal Protein L23 Activates p53 by Inhibiting MDM2 Function in Response to Ribosomal Perturbation but Not to Translation Inhibition. *Molecular and Cellular Biology*, v. 24, n. 17, 1 set. 2004.

DAI, Mu-Shui; LU, Hua. Inhibition of MDM2-mediated p53 Ubiquitination and Degradation by Ribosomal Protein L5. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 43, out. 2004.

DAI, Mu-Shui; SEARS, Rosalie; LU, Hua. Feedback Regulation of c-Myc by Ribosomal Protein L11. *Cell Cycle*, v. 6, n. 22, 15 nov. 2007.

DANG, C. V. MYC, Metabolism, Cell Growth, and Tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 3, n. 8, 1 ago. 2013.

DANIELE, Simona *et al.* Combined inhibition of AKT/mTOR and MDM2 enhances Glioblastoma Multiforme cell apoptosis and differentiation of cancer stem cells. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, 21 set. 2015.

DANILOVA, Nadia; SAKAMOTO, Kathleen M.; LIN, Shuo. Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective

erythropoiesis through activation of p53 protein family. *Blood*, v. 112, n. 13, 15 dez. 2008.

DAVIS, Jessica L. *et al.* PAX2 Expression in Wilms Tumors and Other Childhood Neoplasms. *American Journal of Surgical Pathology*, v. 35, n. 8, ago. 2011.

DE CAMARGO, Beatriz *et al.* Socioeconomic status and the incidence of non-central nervous system childhood embryonic tumours in Brazil. *BMC Cancer*, v. 11, n. 1, 5 dez. 2011.

DE KEERSMAECKER, Kim *et al.* Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, v. 45, n. 2, 23 fev. 2013.

DE SÁ PEREIRA, Bruna M. *et al.* Association between long interspersed nuclear element-1 methylation levels and relapse in Wilms tumors. *Clinical Epigenetics*, v. 9, n. 1, 12 dez. 2017.

DE SÁ PEREIRA, Bruna Maria *et al.* Non-coding RNAs in Wilms' tumor: biological function, mechanism, and clinical implications. *Journal of Molecular Medicine*, 5 maio 2021.

DENG, Changkai *et al.* Genetic variation frequencies in Wilms' tumor: A meta-analysis and systematic review. *Cancer Science*, v. 107, n. 5, 18 maio 2016.

DESIDERI, Enrico; CICCARONE, Fabio; CIRIOLO, Maria Rosa. Targeting Glutathione Metabolism: Partner in Crime in Anticancer Therapy. *Nutrients*, v. 11, n. 8, p. 1926, 16 ago. 2019.

DINIZ, Gulden. Histopathological and Molecular Characteristics of Wilms Tumor. *Wilms Tumor*. [S.l.]: Codon Publications, 2016. .

DIX, David B. *et al.* Treatment of Stage IV Favorable Histology Wilms Tumor With Lung Metastases: A Report From the Children's Oncology Group AREN0533 Study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 36, n. 16, 1 jun. 2018.

DOBIN, Alexander; GINGERAS, Thomas R. Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 51, n. 1, 3 set. 2015.

DOME, Jeffrey S. *et al.* Advances in wilms tumor treatment and biology: Progress through international collaboration. *Journal of Clinical Oncology*. [S.l: s.n.]. , 2015

DOME, Jeffrey S. *et al.* Treatment of Anaplastic Histology Wilms' Tumor: Results From the Fifth National Wilms' Tumor Study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 24, n. 15, 20 maio 2006.

DOME, Jeffrey S.; PERLMAN, Elizabeth J.; GRAF, Norbert. Risk Stratification for

Wilms Tumor: Current Approach and Future Directions. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 2014a.

DOME, Jeffrey S.; PERLMAN, Elizabeth J.; GRAF, Norbert. Risk Stratification for Wilms Tumor: Current Approach and Future Directions. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, n. 34, maio 2014b.

DRUCKER, Harris *et al.* Support vector regression machines. . *Advances in neural information processing systems*, Morgan Kaufmann Publishers, p. 155–161, 1997.

DUHME, Constanze *et al.* WT1-Mutant Wilms Tumor Progression Is Associated With Diverting Clonal Mutations of CTNNB1. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, v. 43, n. 2, mar. 2021.

DUMOUCEL, S. *et al.* Malformations, genetic abnormalities, and wilms tumor. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 61, n. 1, jan. 2014.

EHRlich, Melanie *et al.* Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene*, 2002.

ERB, G. *et al.* Toward improved grading of malignancy in oligodendrogliomas using metabolomics. *Magnetic Resonance in Medicine*, v. 59, n. 5, maio 2008.

FAHY, Eoin *et al.* Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, v. 50, 2009.

FANCELLO, Laura *et al.* The ribosomal protein gene RPL5 is a haploinsufficient tumor suppressor in multiple cancer types. *Oncotarget*, v. 8, n. 9, 28 fev. 2017.

FANOS, V. *et al.* Metabolomics in neonatology and pediatrics. *Clinical Biochemistry*, v. 44, n. 7, maio 2011.

FARIA, Paulo *et al.* Focal Versus Diffuse Anaplasia in Wilms Tumor—New Definitions with Prognostic Significance. *The American Journal of Surgical Pathology*, v. 20, n. 8, ago. 1996.

FERNANDEZ, Conrad. Treatment of Wilms Tumor in the Children’s Oncology Group. [S.l: s.n.], 2014. .

FIALA, Elise M. *et al.* 11p15.5 epimutations in children with Wilms tumor and hepatoblastoma detected in peripheral blood. *Cancer*, v. 126, n. 13, 22 jul. 2020.

FIEHN, Oliver. Combining Genomics, Metabolome Analysis, and Biochemical Modelling to Understand Metabolic Networks. *Comparative and Functional Genomics*, v. 2, n. 3, 2001.

FISHMAN WH. Activation of developmental genes in neoplastic transformation. *Cancer Res*, v. 36, n. 9 PT 2, p. 3423–3428, set. 1976.

FREED, Emily F. *et al.* When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis. *Molecular BioSystems*, v. 6, n. 3, 2010.

FRIEDMAN, R. C. *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, v. 19, n. 1, 29 out. 2008.

FURTWÄNGLER, R. *et al.* Update on Relapses in Unilateral Nephroblastoma Registered in 3 Consecutive SIOP/GPOH Studies - A Report from the GPOH-Nephroblastoma Study Group. *Klinische Pädiatrie*, v. 223, n. 03, 20 maio 2011.

GADD, Samantha; HUFF, Vicki; WALZ, Amy L.; OOMS, Ariadne H.A.G.; ARMSTRONG, Amy E.; GERHARD, Daniela S.; SMITH, Malcolm A.; GUIDRY AUVIL, Jaime M.; *et al.* A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nature Genetics*, 2017.

GADD, Samantha; HUFF, Vicki; WALZ, Amy L.; OOMS, Ariadne H A G; ARMSTRONG, Amy E; GERHARD, Daniela S; SMITH, Malcolm A; AUVIL, Jaime M Guidry; *et al.* A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nature Genetics*, v. 49, n. 10, 21 out. 2017.

GADD, Samantha *et al.* Clinically Relevant Subsets Identified by Gene Expression Patterns Support a Revised Ontogenic Model of Wilms Tumor: A Children's Oncology Group Study. *Neoplasia*, v. 14, n. 8, ago. 2012.

GALARDI, Angela *et al.* MicroRNAs in Neuroblastoma: Biomarkers with Therapeutic Potential. *Current Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 5, 13 fev. 2018.

GARCÍA-GIMÉNEZ, José Luis *et al.* Role of glutathione in the regulation of epigenetic mechanisms in disease. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 112, p. 36–48, nov. 2017.

GAZDA, Hanna T. *et al.* Ribosomal Protein L5 and L11 Mutations Are Associated with Cleft Palate and Abnormal Thumbs in Diamond-Blackfan Anemia Patients. *The American Journal of Human Genetics*, v. 83, n. 6, dez. 2008.

GELLER E; SMERGEL EM; LOWRY PA. Renal neoplasms of childhood. *Radiol Clin North Am*, v. 35, n. 6, p. 1391–1413, 1997.

GELLER, James I.; HOHENSTEIN, Peter. Molecular-Targeted Therapy for Pediatric Renal Tumors. [S.l: s.n.], 2014. .

GESSLER, M. *et al.* Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' tumors. *Human Mutation*, v. 3, n. 3, 1994.

GIDDING, C. Vincristine revisited. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 29, n. 3, fev. 1999.

GILKES, Daniele M; CHEN, Lihong; CHEN, Jiandong. MDMX regulation of p53 response to ribosomal stress. *The EMBO Journal*, v. 25, n. 23, 29 nov. 2006.

GILLES, Arnaud *et al.* Targeting the Human 80S Ribosome in Cancer: From Structure to Function and Drug Design for Innovative Adjuvant Therapeutic Strategies. *Cells*, v. 9, n. 3, 5 mar. 2020.

GRATIAS, Eric J. *et al.* Association of Chromosome 1q Gain With Inferior Survival in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the Children's Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, v. 34, n. 26, 10 set. 2016.

GREEN, Daniel M. *et al.* Pregnancy Outcome After Treatment for Wilms Tumor: A Report From the National Wilms Tumor Long-Term Follow-Up Study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 28, n. 17, 10 jun. 2010.

GRIMM, C *et al.* Association of gamma-glutamyltransferase with severity of disease at diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, v. 109, n. 3, p. 610–614, 16 ago. 2013.

GRUNDY, Paul E. *et al.* Loss of Heterozygosity for Chromosomes 1p and 16q Is an Adverse Prognostic Factor in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the National Wilms Tumor Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 29, 10 out. 2005.

GRY, Marcus *et al.* Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. *BMC Genomics*, v. 10, n. 1, 2009.

GUERRA, João Victor da Silva *et al.* Genes Controlled by DNA Methylation Are Involved in Wilms Tumor Progression. *Cells*, 2019a.

GUERRA, João Victor da Silva *et al.* Genes Controlled by DNA Methylation Are Involved in Wilms Tumor Progression. *Cells*, v. 8, n. 8, 17 ago. 2019b.

GUO, Qie *et al.* CD13: A Key Player in Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, v. 28, n. 5, p. 533–540, 10 dez. 2020.

HABER, Daniel A. *et al.* An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. *Cell*, v. 61, n. 7, jun. 1990.

HAMMER, Elke *et al.* Kidney protein profiling of Wilms' tumor patients by analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Clinica Chimica Acta*, v. 433, jun. 2014.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, n. 5, mar. 2011.

HANCKS, Dustin C.; KAZAZIAN, Haig H. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mobile DNA*, v. 7, n. 1, 6 dez. 2016.

HARTUNG, Franz *et al.* A core program of gene expression characterizes cancer metastases. *Oncotarget*, v. 8, n. 60, 24 nov. 2017.

HASHIDA, Hiroki *et al.* Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: Its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology*, v. 122, n. 2, p. 376–386, fev. 2002.

HAYES, John D.; DINKOVA-KOSTOVA, Albena T.; TEW, Kenneth D. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, v. 38, n. 2, p. 167–197, ago. 2020.

HE, H; SUN, Y. Ribosomal protein S27L is a direct p53 target that regulates apoptosis. *Oncogene*, v. 26, n. 19, 23 abr. 2007.

HECK, Julia E. *et al.* Fetal programming and Wilms tumor. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 66, n. 1, jan. 2019.

HEGDE, Vijay; WANG, Mu; DEUTSCH, Walter A. Human Ribosomal Protein S3 Interacts with DNA Base Excision Repair Proteins hAPE/Ref-1 and hOGG1 †. *Biochemistry*, v. 43, n. 44, nov. 2004.

HELDENBRAND, Jacob R *et al.* Recommendations for performance optimizations when using GATK3.8 and GATK4. *BMC Bioinformatics*, v. 20, n. 1, 8 dez. 2019.

HELLWIG, Birte *et al.* Epsin Family Member 3 and Ribosome-Related Genes Are Associated with Late Metastasis in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer and Long-Term Survival in Non-Small Cell Lung Cancer Using a Genome-Wide Identification and Validation Strategy. *PLOS ONE*, v. 11, n. 12, 7 dez. 2016.

HERMAN, James G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, v. 9, n. 5, out. 1999.

HILL, Rebecca M. *et al.* Combined MYC and P53 Defects Emerge at Medulloblastoma Relapse and Define Rapidly Progressive, Therapeutically Targetable Disease. *Cancer Cell*, v. 27, n. 1, jan. 2015.

HING, Sandra *et al.* Gain of 1q Is Associated with Adverse Outcome in Favorable Histology Wilms' Tumors. *The American Journal of Pathology*, v. 158, n. 2, fev. 2001.

HOFMAN, I J F *et al.* RPL5 on 1p22.1 is recurrently deleted in multiple myeloma and its expression is linked to bortezomib response. *Leukemia*, v. 31, n. 8, 2 ago. 2017.

HONG, Seung Wook *et al.* Risk of gastrointestinal cancer in patients with an elevated level of gamma-glutamyltransferase: A nationwide population-based study. *PLOS ONE*, v. 16, n. 2, p. e0245052, 5 fev. 2021.

HONGYU, Kuang; SANDANIELO, Vera Lúcia Martins; JUNIOR, Gilmar Jorge de Oliveira. Análise de Componentes Principais: Resumo Teórico, Aplicação e Interpretação. *E&S Engineering and Science*, v. 5, n. 1, p. 83–90, 29 jun. 2016.

HORAI, Hisayuki *et al.* MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 45, n. 7, 7 jul. 2010.

HORN, H F; VOUSDEN, K H. Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene*, v. 27, n. 44, 16 out. 2008.

HOWLADER N *et al.* *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017, National Cancer Institute*.

HUANG, Le *et al.* Nephron Progenitor But Not Stromal Progenitor Cells Give Rise to Wilms Tumors in Mouse Models with  $\beta$ -Catenin Activation or Wt1 Ablation and Igf2 Upregulation. *Neoplasia*, v. 18, n. 2, fev. 2016.

HUBBARD, Aubrey K *et al.* Trends in International Incidence of Pediatric Cancers in Children Under 5 Years of Age: 1988–2012. *JNCI Cancer Spectrum*, v. 3, n. 1, 1 mar. 2019.

HUFF, Vicki. Wilms' tumours: about tumour suppressor genes, an oncogene and a chameleon gene. *Nature Reviews Cancer*, v. 11, n. 2, 20 fev. 2011.

IRIZARRY, R. A. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, v. 4, n. 2, 1 abr. 2003.

IRTAN, Sabine; EHRLICH, Peter F.; PRITCHARD-JONES, Kathy. Wilms tumor: “State-of-the-art” update, 2016. *Seminars in Pediatric Surgery*, v. 25, n. 5, out. 2016.

ITANO, Osamu *et al.* Correlation of postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma with demethylation of repetitive sequences. *Oncogene*, v. 21, n. 5, 11 jan. 2002.

JOHANSSON, Peter A. *et al.* Whole genome landscapes of uveal melanoma show an ultraviolet radiation signature in iris tumours. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, 15 dez. 2020.

JOHANSSON, Renzo *et al.* Structural Mechanism of Allosteric Activity Regulation in a Ribonucleotide Reductase with Double ATP Cones. *Structure*, v. 24, n. 6, p. 906–917, jun. 2016.

JONES, P. A.; GONZALGO, M. L. Altered DNA methylation and genome instability: A new pathway to cancer? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 6, 18 mar. 1997.

JU, Huai-Qiang *et al.* NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and

therapeutic implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 5, n. 1, p. 231, 7 dez. 2020.

K. TRIVEDI, Drupad; A. HOLLYWOOD, Katherine; GOODACRE, Royston. Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, v. 3, n. 6, 7 jun. 2017.

KANEHISA, M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 2000.

KANG, Jian *et al.* Ribosomal proteins and human diseases: molecular mechanisms and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, n. 1, p. 323, 30 dez. 2021.

KANG, Min H. *et al.* Initial Testing (Stage 1) of MK-8242-A Novel MDM2 Inhibitor-by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 63, n. 10, out. 2016.

KANWAL, R; GUPTA, S. Epigenetic modifications in cancer. *Clinical Genetics*, v. 81, n. 4, abr. 2012.

KARAGKOUNI, Dimitra *et al.* DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. D1, 4 jan. 2018.

KASINSKI, Andrea L.; SLACK, Frank J. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, v. 11, n. 12, 24 dez. 2011.

KASTE, Sue C. *et al.* Wilms tumour: prognostic factors, staging, therapy and late effects. *Pediatric Radiology*, v. 38, n. 1, 17 jan. 2008.

KATO, Tomotaka *et al.* Cytoplasmic RRM1 activation as an acute response to gemcitabine treatment is involved in drug resistance of pancreatic cancer cells. *PLOS ONE*, v. 16, n. 6, p. e0252917, 10 jun. 2021.

KAWAHATA, Takuto *et al.* Involvement of ribosomal protein L11 expression in sensitivity of gastric cancer against 5-FU. *Oncology Letters*, 24 jan. 2020.

KAZAZIAN, Haig H.; GOODIER, John L. LINE Drive. *Cell*, v. 110, n. 3, ago. 2002.

KELL, Douglas B. Metabolomic biomarkers: search, discovery and validation. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 7, n. 4, 9 jul. 2007.

KENNEDY, Luke *et al.* Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*, v. 10, n. 10, p. 1429, 9 out. 2020.

KHANNA, Neeru *et al.* Differential Gene Expression in Apoptosis: Identification of

Ribosomal Protein S29 as an Apoptotic Inducer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 277, n. 2, out. 2000.

KHATTER, Heena *et al.* Structure of the human 80S ribosome. *Nature*, v. 520, n. 7549, 22 abr. 2015.

KIM, Jong-Hyun *et al.* Over-expression of the ribosomal protein L36a gene is associated with cellular proliferation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, v. 39, n. 1, jan. 2004.

KIM, Joon *et al.* Implication of Mammalian Ribosomal Protein S3 in the Processing of DNA Damage. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 23, jun. 1995.

KIM, Tae-Hyung; LESLIE, Patrick; ZHANG, Yanping. Ribosomal proteins as unrevealed caretakers for cellular stress and genomic instability. *Oncotarget*, v. 5, n. 4, 28 fev. 2014.

KIM, Tae-Sung; KIM, Hag Dong; KIM, Joon. PKC $\delta$ -dependent functional switch of rpS3 between translation and DNA repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1793, n. 2, fev. 2009.

KIM, Woo Jae *et al.* The WTX Tumor Suppressor Enhances p53 Acetylation by CBP/p300. *Molecular Cell*, v. 45, n. 5, mar. 2012.

KLUPCZYŃSKA A; DEREZIŃSKI P; KOKOT ZJ. METABOLOMICS IN MEDICAL SCIENCES--TRENDS, CHALLENGES AND PERSPECTIVES. *Acta Pol Pharm.* , v. 72, n. 4, p. 629–641, 2015.

KOBOLDT, Daniel C. *et al.* VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics*, v. 25, n. 17, 1 set. 2009.

KOFLER, Barbara. Heterogeneity of mitochondrial energy metabolism in classical triphasic Wilms tumor. *Frontiers in Bioscience*, v. E3, n. 1, 2011.

KOHAVI. RON. A Study of Cross-Validation and Bootstrap for Accuracy Estimation and Model Selection. *In: International joint Conference on artificial intelligence*, v. 14, p. 1137–1145, 1995.

KOZOMARA, Ana; BIRGAOANU, Maria; GRIFFITHS-JONES, Sam. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D155–D162, 8 jan. 2019.

KREIDBERG, Jordan A. *et al.* WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, v. 74, n. 4, ago. 1993.

KREIDBERG, Jordan A. WT1 and kidney progenitor cells. *Organogenesis*, v. 6, n. 2, 27 abr. 2010.

KRISHNA, O. H. Radhika *et al.* Immunohistochemical Expression of Ki67 and p53 in Wilms Tumor and Its Relationship with Tumor Histology and Stage at Presentation. *Pathology Research International*, v. 2016, 20 jan. 2016.

KRUBER, Philip *et al.* Loss or oncogenic mutation of *DROSHA* impairs kidney development and function, but is not sufficient for Wilms tumor formation. *International Journal of Cancer*, v. 144, n. 6, 15 mar. 2019.

KRUSE, Jan-Philipp; GU, Wei. Modes of p53 Regulation. *Cell*, v. 137, n. 4, maio 2009.

KURMASHEVA, Raushan T.; HOUGHTON, Peter J. The Use of Pediatric Patient-Derived Xenografts for Identifying Novel Agents and Combinations. [S.l: s.n.], 2017. .

LAFONTAINE, Denis L.J.; TOLLERVEY, David. The function and synthesis of ribosomes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, n. 7, jul. 2001.

LAKOMA, A *et al.* The MDM2 small-molecule inhibitor RG7388 leads to potent tumor inhibition in p53 wild-type neuroblastoma. *Cell Death Discovery*, v. 1, n. 1, 24 dez. 2015.

LAWLOR, Elizabeth R.; THIELE, Carol J. *Epigenetic changes in pediatric solid tumors: Promising new targets. Clinical Cancer Research*. [S.l: s.n.]. , 2012

LAWRENCE, Michael S. *et al.* Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, v. 505, n. 7484, 5 jan. 2014.

LI, Dingshan; LI, Yongsheng. The interaction between ferroptosis and lipid metabolism in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 5, n. 1, p. 108, 30 dez. 2020.

LI, Wenliang *et al.* A Gene Expression Signature for Relapse of Primary Wilms Tumors. *Cancer Research*, v. 65, n. 7, 1 abr. 2005.

LIAO, J-M *et al.* Ribosomal proteins L5 and L11 co-operatively inactivate c-Myc via RNA-induced silencing complex. *Oncogene*, v. 33, n. 41, 21 out. 2014.

LIN, Lin *et al.* LC-MS based serum metabonomic analysis for renal cell carcinoma diagnosis, staging, and biomarker discovery. *Journal of Proteome Research*, v. 10, n. 3, 4 mar. 2011.

LIN, Shuibin; GREGORY, Richard I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2015 15:6, v. 15, n. 6, p. 321–333, 22 maio 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrc3932>>. Acesso em: 1 mar. 2022.

LINDON, John C.; NICHOLSON, Jeremy K.; EVERETT, Jeremy R. NMR Spectroscopy of Biofluids. [S.l: s.n.], 1999. .

LINDSTRÖM, Mikael S.; ZHANG, Yanping. Ribosomal Protein S9 Is a Novel B23/NPM-binding Protein Required for Normal Cell Proliferation. *Journal of Biological*

*Chemistry*, v. 283, n. 23, jun. 2008.

LINDSTROM, Mikael S *et al.* Putting a Finger on Growth Surveillance: Insight into MDM2 Zinc Finger-Ribosomal Protein Interactions. *Cell Cycle*, v. 6, n. 4, p. 434–437, 2007. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=kccy20http://www.landesbioscience.com/journals/cc/abstract.php?id=3861>>.

LIU, Esther K.; SUSON, Kristina D. Syndromic Wilms tumor: a review of predisposing conditions, surveillance and treatment. *Translational Andrology and Urology*, v. 9, n. 5, out. 2020.

LIU XX; GONG HF; ZHAO XX. Correlation of RGS4 and P16 expressions with pediatric nephroblastoma and its significance on prognosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, v. 21, n. 20, p. 4577–4583, out. 2017.

LIU, Ziru *et al.* ACO2 and ANPEP as novel prognostic markers for gallbladder squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinomas. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 25, n. 7, p. 1346–1355, 5 jul. 2020.

LOHRUM, Marion A.E *et al.* Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell*, v. 3, n. 6, jun. 2003.

LOPEZ-SERRA, P; ESTELLER, M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene*, v. 31, n. 13, 22 mar. 2012.

LOVE, Michael I; HUBER, Wolfgang; ANDERS, Simon. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, v. 15, n. 12, 5 dez. 2014.

LU, Jun *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005.

LUDWIG, Nicole *et al.* Combining miRNA and mRNA Expression Profiles in Wilms Tumor Subtypes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 4, 30 mar. 2016.

LUO, Wen *et al.* Glutathione S-Transferases in Pediatric Cancer. *Frontiers in Oncology*, v. 1, 2011.

MA, J.; DONG, C.; JI, C. *MicroRNA and drug resistance. Cancer Gene Therapy*. [S.l.: s.n.], 2010

MACIASZEK, Jamie L; OAK, Ninad; NICHOLS, Kim E. Recent advances in Wilms' tumor predisposition. *Human Molecular Genetics*, v. 29, n. R2, 20 out. 2020.

MACLELLAN, Dawn *et al.* Urinary metabolite profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy to distinguish control patients from Wilms tumor (WT) and WT tumor by stage. *Journal of Clinical Oncology*, v. 32, n. 15\_suppl, 20 maio 2014.

MAGRO, Gaetano *et al.* Immunohistochemistry as potential diagnostic pitfall in the most common solid tumors of children and adolescents. *Acta Histochemica*, v. 117, n. 4–5, maio 2015.

MAHAMDALLIE, Shazia *et al.* Identification of new Wilms tumour predisposition genes: an exome sequencing study. *The Lancet Child & Adolescent Health*, v. 3, n. 5, maio 2019.

MAJOR, M. B. *et al.* Wilms Tumor Suppressor WTX Negatively Regulates WNT/ - Catenin Signaling. *Science*, v. 316, n. 5827, 18 maio 2007.

MARKOVSKY, Ela *et al.* Large Molecule Therapeutics Wilms Tumor NCAM-Expressing Cancer Stem Cells as Potential Therapeutic Target for Polymeric Nanomedicine. 2017. Disponível em: <[www.aacrjournals.org](http://www.aacrjournals.org)>.

MASCHIETTO, Mariana *et al.* Gene expression analysis of blastemal component reveals genes associated with relapse mechanism in Wilms tumour. *European Journal of Cancer*, v. 47, n. 18, dez. 2011.

MASCHIETTO, Mariana *et al.* Molecular Profiling of Isolated Histological Components of Wilms Tumor Implicates a Common Role for the Wnt Signaling Pathway in Kidney and Tumor Development. *Oncology*, v. 75, n. 1–2, 2008.

MASCHIETTO, Mariana; CHARLTON, Jocelyn; *et al.* The IGF signalling pathway in Wilms tumours - A report from the ENCCA Renal Tumours Biology-driven drug development workshop. *Oncotarget*, v. 5, n. 18, 30 set. 2014.

MASCHIETTO, Mariana; WILLIAMS, Richard D.; *et al.* TP53 Mutational Status Is a Potential Marker for Risk Stratification in Wilms Tumour with Diffuse Anaplasia. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 14 out. 2014.

MATÉS, José M. *et al.* Glutaminases regulate glutathione and oxidative stress in cancer. *Archives of Toxicology*, v. 94, n. 8, p. 2603–2623, 18 ago. 2020.

MAZZU, Ying Z. *et al.* A Novel Mechanism Driving Poor-Prognosis Prostate Cancer: Overexpression of the DNA Repair Gene, Ribonucleotide Reductase Small Subunit M2 (RRM2). *Clinical Cancer Research*, v. 25, n. 14, p. 4480–4492, 15 jul. 2019.

MCCOOL, Mason A.; BRYANT, Carson J.; BASERGA, Susan J. MicroRNAs and long non-coding RNAs as novel regulators of ribosome biogenesis. *Biochemical Society Transactions*, v. 48, n. 2, 29 abr. 2020.

MCGEARY, Sean E. *et al.* The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science*, v. 366, n. 6472, 20 dez. 2019.

MCMANUS, Joel; CHENG, Zhe; VOGEL, Christine. Next-generation analysis of gene

expression regulation – comparing the roles of synthesis and degradation. *Molecular BioSystems*, v. 11, n. 10, 2015.

MEI, Y. P. *et al.* Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis. *Oncogene*, 2012.

MILIANI DE MARVAL, Paula L.; ZHANG, Yanping. The RP-Mdm2-p53 Pathway and Tumorigenesis. *Oncotarget*, v. 2, n. 3, 31 mar. 2011.

MINA-OSORIO, Paola. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in Molecular Medicine*, v. 14, n. 8, p. 361–371, ago. 2008.

MOCO, Sofia *et al.* Metabolomics perspectives in pediatric research. *Pediatric Research*, v. 73, n. 2–4, 11 abr. 2013.

MONSAINGEON, Maud *et al.* Comparative values of catecholamines and metabolites for the diagnosis of neuroblastoma. *European Journal of Pediatrics*, v. 162, n. 6, 27 jun. 2003.

MONTEIRO, M.S. *et al.* Metabolomics Analysis for Biomarker Discovery: Advances and Challenges. *Current Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 2, 1 jan. 2013.

MOORE AW *et al.* YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development*, v. 126, n. 9, p. 1845–1857, 1999.

MOORE, Lisa D; LE, Thuc; FAN, Guoping. DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, v. 38, n. 1, p. 23–38, 11 jan. 2013.

MURPHY, Michael F.G. *et al.* Childhood and adult cancers: Contrasts and commonalities. *Maturitas*, v. 76, n. 1, set. 2013.

MYASNIKOV, Alexander G. *et al.* Structure–function insights reveal the human ribosome as a cancer target for antibiotics. *Nature Communications*, v. 7, n. 1, 26 nov. 2016.

NAOYA IKEDA *et al.* Clinical significance of aminopeptidase N/CD13 expression in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res*, v. 9, n. 4, p. 1503–1508, abr. 2003.

NEBERT, Daniel W; VASILIOU, Vasilis. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Human Genomics*, v. 1, n. 6, p. 460, 2004.

OLIVER, S. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 9, 1 set. 1998.

OOMS, Ariadne H.A.G. *et al.* Renal Tumors of Childhood—A Histopathologic Pattern-Based Diagnostic Approach. *Cancers*, v. 12, n. 3, 19 mar. 2020.

OOMS, Ariadne H.A.G. *et al.* Significance of *TP53* Mutation in Wilms Tumors with

Diffuse Anaplasia: A Report from the Children's Oncology Group. *Clinical Cancer Research*, v. 22, n. 22, 15 nov. 2016.

OOSTVEEN, Radna Minou; PRITCHARD-JONES, Kathy. Pharmacotherapeutic Management of Wilms Tumor: An Update. *Pediatric Drugs*, 2019.

ORŠOLIĆ, Ines *et al.* Cancer-associated mutations in the ribosomal protein L5 gene dysregulate the HDM2/p53-mediated ribosome biogenesis checkpoint. *Oncogene*, v. 39, n. 17, 23 abr. 2020.

Paediatric renal tumours: perspectives from the SIOP-RTSG. *Nature Reviews Urology*, v. 14, n. 1, 6 jan. 2017.

PANDA, Anshuman *et al.* Tissue- and development-stage-specific mRNA and heterogeneous CNV signatures of human ribosomal proteins in normal and cancer samples. *Nucleic Acids Research*, 11 jun. 2020.

PAVLOVA, Natalya N.; THOMPSON, Craig B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, v. 23, n. 1, jan. 2016.

PELAVA, Andria; SCHNEIDER, Claudia; WATKINS, Nicholas J. The importance of ribosome production, and the 5S RNP-MDM2 pathway, in health and disease. *Biochemical Society Transactions*, v. 44, n. 4, 15 ago. 2016.

PERCICOTE, Ana Paula *et al.* Immunohistochemical expression of p53, BCL-2, BAX and VEGFR1 proteins in nephroblastomas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 49, n. 1, fev. 2013.

PERCICOTE, Ana Paula *et al.* Tissue expression of retinoic acid receptor alpha and CRABP2 in metastatic nephroblastomas. *Diagnostic Pathology*, v. 13, n. 1, 22 dez. 2018.

PERLMAN, Elizabeth J. *et al.* MLLT1 YEATS domain mutations in clinically distinctive Favourable Histology Wilms tumours. *Nature Communications*, v. 6, n. 1, 4 dez. 2015.

PERLMAN, Elizabeth J. Pediatric Renal Tumors: Practical Updates for the Pathologist. *Pediatric and Developmental Pathology*, v. 8, n. 3, 10 maio 2005.

PETERS, Timothy J *et al.* De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics & Chromatin*, v. 8, n. 1, 27 dez. 2015.

PHELPS, Doris *et al.* Inhibition of MDM2 by RG7388 confers hypersensitivity to X-radiation in xenograft models of childhood sarcoma. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 62, n. 8, ago. 2015.

PODE-SHAKKED, Naomi *et al.* The isolation and characterization of renal cancer initiating cells from human Wilms' tumour xenografts unveils new therapeutic targets.

[S.d.]. Disponível em: <[www.embomolmed.org](http://www.embomolmed.org)>.

POPOV, Sergey D.; SEBIRE, Neil J.; VUJANIC, Gordan M. Wilms' Tumour – Histology and Differential Diagnosis. *Wilms Tumor*. [S.l.]: Codon Publications, 2016. .

PRITCHARD-JONES, K. Controversies and advances in the management of Wilms' tumour. *Archives of Disease in Childhood*, v. 87, n. 3, 1 set. 2002.

PRITCHARD-JONES, Kathy *et al.* Omission of doxorubicin from the treatment of stage II–III, intermediate-risk Wilms' tumour (SIOP WT 2001): an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *The Lancet*, v. 386, n. 9999, set. 2015.

PRITCHARD-JONES, Kathy; DOME, Jeffrey S. (Org.). *Renal Tumors of Childhood*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014.

QUINTERO ESCOBAR, Melissa *et al.* biomolecules Insights into the Chemical Biology of Childhood Embryonal Solid Tumors by NMR-Based Metabolomics. 2019. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/biomolecules](http://www.mdpi.com/journal/biomolecules)>.

RADOJEVIĆ-ŠKODRIĆ, Sanja *et al.* Immunohistochemical analysis of cyclin A expression in Wilms tumor. *PeerJ*, v. 6, 11 jan. 2019.

RAKHEJA, Dinesh *et al.* Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nature Communications*, 2014a.

RAKHEJA, Dinesh *et al.* Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nature Communications*, v. 5, n. 1, 17 dez. 2014b.

RALSTON, A; SHAW, K. Gene Expression Regulates Cell Differentiation. *Nature Education*, v. 1, n. 1, p. 127- undefined, 2008.

RAO, Shuyun *et al.* Inactivation of ribosomal protein L22 promotes transformation by induction of the stemness factor, Lin28B. *Blood*, v. 120, n. 18, 1 nov. 2012.

RATHER, Gulam Mohmad *et al.* In cancer, all roads lead to NADPH. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 226, p. 107864, out. 2021.

REN, Yanming *et al.* Identification of RPL5 and RPL10 as novel diagnostic biomarkers of Atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Cancer Cell International*, v. 18, n. 1, 20 dez. 2018.

RIES LAG *et al.* *Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. Bethesda, MD: National Cancer Institute, SEER Program. NIH Pub., 1999. v. No. 99-4649.

RILEY, Richard D *et al.* *A Systematic Review of Molecular and Biological Tumor*

*Markers in Neuroblastoma*. [S.l.: s.n.], 2004. Disponível em: <<http://www.prw.le.ac.uk/epidemiology/personal/rdr3/>>.

RITCHIE, Matthew E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 7, 20 abr. 2015.

RIVERA, M. N. *et al.* An X Chromosome Gene, WTX, Is Commonly Inactivated in Wilms Tumor. *Science*, v. 315, n. 5812, 2 fev. 2007.

RIVERA, M. N. *et al.* The tumor suppressor WTX shuttles to the nucleus and modulates WT1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 20, 19 maio 2009.

RIVERA, Miguel N.; HABER, Daniel A. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, n. 9, 19 set. 2005.

ROSSI, Derrick J. *et al.* Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*, v. 447, n. 7145, jun. 2007.

RUGGERO, Davide; PANDOLFI, Pier Paolo. Does the ribosome translate cancer? *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 3, mar. 2003.

RUTESHOUSER, E. Cristy; HUFF, Vicki. Familial Wilms tumor. *American Journal of Medical Genetics*, v. 129C, n. 1, 15 ago. 2004.

SAGHAFINIA, Sadegh *et al.* Pan-Cancer Landscape of Aberrant DNA Methylation across Human Tumors. *Cell Reports*, v. 25, n. 4, out. 2018.

SARADHI, V.V.; KARNIK, H.; MITRA, P. A decomposition method for support vector clustering. [S.d.], [S.l.]: IEEE, [S.d.]. p. 268–271.

SATOH, Y *et al.* Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumours. *British Journal of Cancer*, v. 95, n. 4, 8 ago. 2006.

SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, v. 27, n. 6, 15 mar. 2011.

SCHMITTGEN, Thomas D; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v. 3, n. 6, 5 jun. 2008.

SCHMUTTE C; JONES PA. Involvement of DNA methylation in human carcinogenesis. *Biological Chemistry*, v. 379, n. 4–5, jan. 1998.

SCOTT, R H. Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumour. *Journal of Medical Genetics*, v. 43, n. 9, 5 abr. 2006.

SCOTT, Richard H. *et al.* Stratification of wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget*, 2012a.

SCOTT, Richard H. *et al.* Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget*, v. 3, n. 3, 31 mar. 2012b.

SEBIRE, Neil J. *et al.* Immunohistochemical Findings in Embryonal Small Round Cell Tumors With Molecular Diagnostic Confirmation. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v. 13, n. 1, mar. 2005.

SEBIRE, Neil J; VUJANIC, Gordan M. Paediatric renal tumours: recent developments, new entities and pathological features. *Histopathology*, v. 54, n. 5, abr. 2009.

SEEBACHER, V *et al.* Prognostic significance of gamma-glutamyltransferase in patients with endometrial cancer: a multi-centre trial. *British Journal of Cancer*, v. 106, n. 9, p. 1551–1555, 7 abr. 2012.

SEGERS, H. *et al.* Frequency of WT1 and 11p15 constitutional aberrations and phenotypic correlation in childhood Wilms tumour patients. *European Journal of Cancer*, v. 48, n. 17, nov. 2012.

SEHIC, Daniel *et al.* SIX1 protein expression selectively identifies blastemal elements in Wilms tumor. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 59, n. 1, 15 jul. 2012.

SENANAYAKE, Upeka *et al.* The pluripotent renal stem cell regulator SIX2 is activated in renal neoplasms and influences cellular proliferation and migration. *Human Pathology*, v. 44, n. 3, mar. 2013.

SHENOY, Niraj *et al.* Alterations in the ribosomal machinery in cancer and hematologic disorders. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 5, n. 1, 2012.

SHUKRUN, Rachel *et al.* Wilms' Tumor Blastemal Stem Cells Dedifferentiate to Propagate the Tumor Bulk. *Stem Cell Reports*, v. 3, n. 1, jul. 2014.

SI, Wengong *et al.* The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical Epigenetics*, v. 11, n. 1, 11 dez. 2019.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 1, jan. 2018.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 70, n. 1, 8 jan. 2020.

SKOTNICKA-KLONOWICZ, G *et al.* 16q heterozygosity loss in Wilms» tumour in children and its clinical importance. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, v. 26, n. 1, fev. 2000.

SLUPSKY, Carolyn M. *et al.* Urine Metabolite Analysis Offers Potential Early Diagnosis of Ovarian and Breast Cancers. *Clinical Cancer Research*, v. 16, n. 23, 1 dez. 2010.

SONN, Geoffrey; SHORTLIFFE, Linda M.D. *Management of Wilms tumor: Current*

standard of care. *Nature Clinical Practice Urology*. [S.l: s.n.], 2008

SPIGA, Laura *et al.* Metabolomics in paediatric oncology: a potential still to be exploited. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 26, n. sup2, 23 out. 2013.

SPREAFICO, Filippo *et al.* Treatment of relapsed Wilms tumors: lessons learned. *Expert Review of Anticancer Therapy*, v. 9, n. 12, 10 dez. 2009.

SPREAFICO, Filippo; BELLANI, Franca Fossati. Wilms' tumor: past, present and (possibly) future. *Expert Review of Anticancer Therapy*, v. 6, n. 2, 10 fev. 2006.

SREDNI, Simone T. *et al.* Subsets of Very Low Risk Wilms Tumor Show Distinctive Gene Expression, Histologic, and Clinical Features. *Clinical Cancer Research*, v. 15, n. 22, 15 nov. 2009.

SREDNI, Simone Treiger *et al.* Pan-cytokeratin immunoexpression in Wilms' tumors: a simple approach for understanding tumor epithelial differentiation. *Sao Paulo Medical Journal*, v. 122, n. 4, 2004.

SUBRAMANIAN, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 43, 25 out. 2005.

SULIMA, S. O. *et al.* Bypass of the pre-60S ribosomal quality control as a pathway to oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 15, 15 abr. 2014.

SULIMA, Sergey O. *et al.* Ribosomal Lesions Promote Oncogenic Mutagenesis. *Cancer Research*, v. 79, n. 2, p. 320–327, 15 jan. 2019.

SUN, Xiao-Xin *et al.* Perturbation of 60 S Ribosomal Biogenesis Results in Ribosomal Protein L5- and L11-dependent p53 Activation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 33, ago. 2010.

SUNDQVIST, Anders *et al.* Regulation of nucleolar signalling to p53 through NEDDylation of L11. *EMBO reports*, v. 10, n. 10, 28 out. 2009.

SZYCHOT E; APPS J; PRITCHARD-JONES K. Wilms' tumor: biology, diagnosis and treatment. *Transl Pediatr.*, v. 3, n. 1, p. 12–24, jan. 2014.

TANG, Fucai *et al.* Prognostic Factors and Nomograms to Predict Overall and Cancer-Specific Survival for Children with Wilms' Tumor. *Disease Markers*, v. 2019, 3 dez. 2019.

TANIGUCHI, T. *et al.* Epigenetic changes encompassing the IGF2/H19 locus associated with relaxation of IGF2 imprinting and silencing of H19 in Wilms tumor.

*Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 92, n. 6, 14 mar. 1995.

TARAN K *et al.* Minichromosome maintenance 2 (MCM2) is a new prognostic proliferative marker in Wilms tumour. . *Pol J Pathol*, v. 62, n. 2, p. 84–88, 2011.

TASIC, Ljubica *et al.* A Metabonomic View on Wilms Tumor by High-Resolution Magic-Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Diagnostics*, v. 12, n. 1, p. 157, 10 jan. 2022.

TERMUHLEN, Amanda M. *et al.* Twenty-five year follow-up of childhood Wilms tumor: A report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 57, n. 7, 15 dez. 2011.

TERZIAN, Simon S. *et al.* Crystal structures of glutathione- and inhibitor-bound human GGT1: critical interactions within the cysteinylglycine binding site. *Journal of Biological Chemistry*, v. 296, p. 100066, jan. 2021.

TISATO, Veronica *et al.* MDM2/X inhibitors under clinical evaluation: perspectives for the management of hematological malignancies and pediatric cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, v. 10, n. 1, 3 dez. 2017.

TORREZAN, Giovana T. *et al.* Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nature Communications*, v. 5, n. 1, 9 set. 2014.

TRINK, Ariel *et al.* Geometry of Gene Expression Space of Wilms' Tumors From Human Patients. *Neoplasia*, v. 20, n. 8, ago. 2018.

TZIKA, A. Aria *et al.* Biochemical characterization of pediatric brain tumors by using in vivo and ex vivo magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Neurosurgery*, v. 96, n. 6, jun. 2002.

VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, Marry M. *et al.* Position Paper: Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol. *Nature Reviews Urology*, 2017.

VASEI, Mohammad *et al.* Immunohistochemical Profiling of Wilms Tumor. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, v. 16, n. 2, mar. 2008.

VLACHOS, Adrianna *et al.* Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood*, v. 119, n. 16, 19 abr. 2012.

VOLAREVIC, S. Proliferation, But Not Growth, Blocked by Conditional Deletion of 40S Ribosomal Protein S6. *Science*, v. 288, n. 5473, 16 jun. 2000.

VUJANĆ, Gordan M.; CHARLES, Adrian K. Renal tumours of childhood: an update. *Pathology*, v. 40, n. 2, fev. 2008.

VUJANIĆ, Gordan M. *et al.* New definitions of focal and diffuse anaplasia in Wilms tumor: The International Society of Paediatric Oncology (SIOP) experience. *Medical and Pediatric Oncology*, v. 32, n. 5, maio 1999.

VUJANIĆ, Gordan M. *et al.* The UMBRELLA SIOP–RTSG 2016 Wilms tumour pathology and molecular biology protocol. *Nature Reviews Urology*, v. 15, n. 11, 11 nov. 2018.

WALZ, Amy L. *et al.* Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX Homeodomain Mutations in Favorable Histology Wilms Tumors. *Cancer Cell*, 2015.

WANG, Wei *et al.* Ribosomal Proteins and Human Diseases: Pathogenesis, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Implications. *Medicinal Research Reviews*, v. 35, n. 2, mar. 2015.

WANZEL, Michael *et al.* A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nature Cell Biology*, v. 10, n. 9, 1 set. 2008.

WARNER, Jonathan R.; MCINTOSH, Kerri B. How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins? *Molecular Cell*, v. 34, n. 1, abr. 2009.

WEGERT, Jenny *et al.* Mutations in the SIX1/2 Pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA Microprocessor Complex Underlie High-Risk Blastemal Type Wilms Tumors. *Cancer Cell*, 2015.

WEGERT, Jenny *et al.* TP53 alterations in Wilms tumour represent progression events with strong intratumour heterogeneity that are closely linked but not limited to anaplasia. *Journal of Pathology: Clinical Research*, v. 3, n. 4, p. 234–248, 2017.

WEI, Jia-Ru; DONG, Jun; LI, Lei. Cancer-associated fibroblasts-derived gamma-glutamyltransferase 5 promotes tumor growth and drug resistance in lung adenocarcinoma. *Aging*, v. 12, n. 13, p. 13220–13233, 8 jul. 2020.

WEI, Qinyao *et al.* Metabolic rewiring in the promotion of cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. *Oncogene*, v. 39, n. 39, 24 set. 2020.

WEIRICH, A. *et al.* Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. *Annals of Oncology*, v. 12, n. 3, mar. 2001.

WHIBLEY, Catherine; PHAROAH, Paul D. P.; HOLLSTEIN, Monica. p53 polymorphisms: cancer implications. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, n. 2, fev. 2009.

WIDSCHWENDTER, Martin *et al.* DNA Hypomethylation and Ovarian Cancer Biology. *Cancer Research*, v. 64, n. 13, 1 jul. 2004.

WIKSTRÖM, Sakari; PARKKULAINEN, K.V.; LOUHIMO, Ilmo. Bilateral Wilms' tumor

and secondary malignancies. *Journal of Pediatric Surgery*, v. 17, n. 3, jun. 1982.

WILLIAMS J *et al.* Methylation of chromosome 11p genes in wilms-tumor and kidney tissue. *Int J Oncol.*, v. 1, n. 7, p. 743–746, dez. 1992.

WILLIAMS, Richard D. *et al.* Molecular profiling reveals frequent gain of MYCN and anaplasia-specific loss of 4q and 14q in wilms tumor. *Genes, Chromosomes and Cancer*, v. 50, n. 12, dez. 2011.

WILLIAMS, Richard D. *et al.* Multiple mechanisms of MYCN dysregulation in Wilms tumour. *Oncotarget*, v. 6, n. 9, 30 mar. 2015.

WILSON, Ann S.; POWER, Barbara E.; MOLLOY, Peter L. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1775, n. 1, jan. 2007.

WISHART, David S. *et al.* HMDB 3.0—The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Research*, v. 41, n. D1, 17 nov. 2012.

WISHART, David S *et al.* HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. D1, 4 jan. 2018.

WONG, Kwok F. *et al.* Risk of Adverse Health and Social Outcomes Up to 50 Years After Wilms Tumor: The British Childhood Cancer Survivor Study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 34, n. 15, 20 maio 2016.

WONG, P. *et al.* Combining Targeted Agents With Modern Radiotherapy in Soft Tissue Sarcomas. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, v. 106, n. 11, 18 out. 2014.

WU, Hao *et al.* Metabolomic investigation of gastric cancer tissue using gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 396, n. 4, 16 fev. 2010.

XU, Qing-Song; LIANG, Yi-Zeng; DU, Yi-Ping. Monte Carlo cross-validation for selecting a model and estimating the prediction error in multivariate calibration. *Journal of Chemometrics*, v. 18, n. 2, p. 112–120, fev. 2004.

XU, Xilong; XIONG, Xiufang; SUN, Yi. The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. *Science China Life Sciences*, v. 59, n. 7, 13 jul. 2016.

XUE, Shifeng; BARNA, Maria. Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 6, 23 jun. 2012.

YANG, Zhenxing *et al.* RRM1 predicts clinical outcome of high-and intermediate-risk non-muscle-invasive bladder cancer patients treated with intravesical gemcitabine

monotherapy. *BMC Urology*, v. 19, n. 1, p. 69, 24 dez. 2019.

YOUNG, Matthew D. *et al.* Single-cell transcriptomes from human kidneys reveal the cellular identity of renal tumors. *Science*, v. 361, n. 6402, 10 ago. 2018.

YU, Jing; MCMAHON, Andrew P; VALERIUS, M Todd. Recent genetic studies of mouse kidney development. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 14, n. 5, out. 2004.

ZANJIRBAND, Maryam; RAHGOZAR, Soheila. Targeting p53-MDM2 Interaction Using Small Molecule Inhibitors and the Challenges Needed to be Addressed. *Current Drug Targets*, v. 20, n. 11, 22 ago. 2019.

ZAPATA-TARRES, Marta *et al.* Expression of YY1 in Wilms tumors with favorable histology is a risk factor for adverse outcomes. *Future Oncology*, v. 15, n. 11, abr. 2019.

ZHAN, Yougen *et al.* Dystroglycan and Mitochondrial Ribosomal Protein L34 Regulate Differentiation in the Drosophila Eye. *PLoS ONE*, v. 5, n. 5, 5 maio 2010.

ZHANG, B.; KIROV, S.; SNODDY, J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Research*, v. 33, n. Web Server, 1 jul. 2005.

ZHANG Y *et al.* Zhang Y, Shields T, Crenshaw T, Hao Y, Moulton T, Tycko B. Imprinting of human H19: allele-specific CpG methylation, loss of the active allele in Wilms tumor, and potential for somatic allele switching. *Am J Hum Genet.* 1993;53(1):113-124. *Am J Hum Genet*, v. 53, n. 1, p. 113–124, 1993.

ZHANG, Yanping *et al.* Ribosomal Protein L11 Negatively Regulates Oncoprotein MDM2 and Mediates a p53-Dependent Ribosomal-Stress Checkpoint Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, v. 23, n. 23, 1 dez. 2003.

ZHANG, Yanping; LU, Hua. Signaling to p53: Ribosomal Proteins Find Their Way. *Cancer Cell*, v. 16, n. 5, nov. 2009.

ZHOU, Xiang *et al.* Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 2, abr. 2015.

ZHU, Yan *et al.* Ribosomal Protein S7 Is Both a Regulator and a Substrate of MDM2. *Molecular Cell*, v. 35, n. 3, ago. 2009.

ZHU, Yiming *et al.* The potential role of c-MYC and polyamine metabolism in multiple drug resistance in bladder cancer investigated by metabonomics. *Genomics*, v. 114, n. 1, p. 125–137, jan. 2022.

ZHUANG, Sujing *et al.* RRM2 elicits the metastatic potential of breast cancer cells by

regulating cell invasion, migration and VEGF expression via the PI3K/AKT signaling. *Oncology Letters*, 3 mar. 2020.

ZIRN, B. *et al.* Expression profiling of Wilms tumors reveals new candidate genes for different clinical parameters. *International Journal of Cancer*, v. 118, n. 8, 15 abr. 2006.

ZUPPAN, Craig W.; BECKWITH, J. Bruce; LUCKEY, Dennis W. Anaplasia in unilateral Wilms' tumor: A report from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center. *Human Pathology*, v. 19, n. 10, out. 1988.

## **15. ANEXOS**

**ANEXO 1:** PARECER CEP

**ANEXO 2:** DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS CASOS UTILIZADOS NAS METODOLOGIAS DESCRITAS NO CAPÍTULO 1.

**ANEXO 3:** FLUXO DE SELEÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NAS ANÁLISES DO METABOLOMA E CORRESPONDÊNCIA ENTRE OS PARES DE AMOSTRAS RN E TW

**ANEXO 4:** DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS CASOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DO METABOLOMA DESCRITAS NO CAPÍTULO 2.

**ANEXO 5:** DADOS DE EXPRESSÃO DOS GENES E METABÓLITOS IDENTIFICADOS PELAS ANÁLISES DE INTEGRAÇÃO DO METABOLOMA E TRANSCRIPTOMA ENTRE TW E RN.

**ANEXO 6:** ARTIGO PUBLICADO (*CLINICAL EPIGENETICS*)

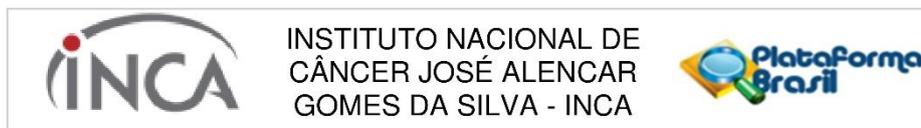
**ANEXO 7:** ARTIGO PUBLICADO (*REVISTA DA ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA*)

**ANEXO 8:** ARTIGO PUBLICADO (*CELLS*)

**ANEXO 9:** ARTIGO PUBLICADO (*JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE*)

**ANEXO 10:** ARTIGO PUBLICADO (*DIAGNOSTICS*)

## ANEXO 1: PARECER CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do impacto funcional de RPL5 e RPL11 no desenvolvimento e progressão de tumores de Wilms.

**Pesquisador:** Beatriz de Camargo

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

**Versão:** 2

**CAAE:** 09981018.3.0000.5274

**Instituição Proponente:** Coordenação de Pesquisa

**Patrocinador Principal:** Instituto Nacional de Câncer/ INCA/ RJ  
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ  
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

#### DADOS DA NOTIFICAÇÃO

**Tipo de Notificação:** Envio de Relatório Parcial

**Detalhe:**

**Justificativa:**

**Data do Envio:** 13/08/2019

**Situação da Notificação:** Parecer Consubstanciado Emitido

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.506.903

#### Apresentação da Notificação:

- Projeto de Pesquisa Aprovado pelo Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 3.320.149, datado de 12 de Maio de 2019.

- A presente Notificação trata da apresentação do Relatório Parcial, conforme arquivo "Relatorio\_parcial\_Bruna.doc".

#### Objetivo da Notificação:

- A presente Notificação trata da apresentação do Relatório Parcial, conforme arquivo "Relatorio\_parcial\_Bruna.doc".

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 204  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 20.231-092  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE  
CÂNCER JOSÉ ALENCAR  
GOMES DA SILVA - INCA



Continuação do Parecer: 3.506.903

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

- A presente Notificação trata da apresentação do Relatório Parcial, conforme arquivo "Relatorio\_parcial\_Bruna.doc".

**Comentários e Considerações sobre a Notificação:**

- A presente Notificação trata da apresentação do Relatório Parcial, conforme arquivo "Relatorio\_parcial\_Bruna.doc".

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- A presente Notificação trata da apresentação do Relatório Parcial, conforme arquivo "Relatorio\_parcial\_Bruna.doc".

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS Nº 466/2012 e na Norma Operacional CNS Nº 001/2013 manifesta-se pela aprovação da Notificação ao projeto de pesquisa proposto.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Envio de Relatório Parcial	Relatorio_parcial_Bruna.doc	13/08/2019 14:56:33	BRUNA MARIA DE SA PEREIRA	Postado

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 204  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 20.231-092  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br

Página 02 de 03



INSTITUTO NACIONAL DE  
CÂNCER JOSÉ ALENCAR  
GOMES DA SILVA - INCA



Continuação do Parecer: 3.506.903

RIO DE JANEIRO, 14 de Agosto de 2019

---

**Assinado por:**  
**Carlos Henrique Debenedito Silva**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 204  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 20.231-092  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br

Página 03 de 03

## ANEXO 2: DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS CASOS UTILIZADOS NAS METODOLOGIAS DESCRITAS NO CAPÍTULO 1.

ID	Idade ao diagnóstico (anos)	Sexo	Metástase ao diagnóstico	Local da metástase ao diagnóstico	Recaída	Local da recidiva	Histologia do tumor	Anaplasia difusa	Estadimento Patológico	Classificação de risco	WB	Expressão gênica RT-PCRq (validação)	Expressão de miRNAs (validação)	RNA-Seq	Microarranjo metilação	Microarranjo miRNA
DCM	6	M	Não	-	Sim	Pulmão	Misto	Não	I	Intermediário	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	
MAM BB	3	M	Não	-	Sim	Pulmão	Misto	Não	I	Intermediário	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	
MCX	2	M	Sim	Linfonodo	Sim	Pulmão	Misto	Não	III	Intermediário	SIM	SIM	SIM			
LSB	3	F	Não	-	Sim	Pulmão	Misto	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	SIM	SIM		
TBS	5	M	Não	-	Sim	Pulmão	Misto	Não	I	Intermediário	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	
ACS L	2	F	Sim	Linfonodo	Sim	Pulmão	Misto	Não	III	Intermediário		SIM	SIM			
DSG	1	F	Sim	Linfonodo/pulmão	Sim	Pulmão	epitelia I	Não	III	Intermediário		SIM	SIM			
PHG B	9	M	Não	-	Sim	Pulmão	regressivo (viável: misto)	Não	I	Intermediário		SIM	SIM			SIM
POE	4	M	Sim	Linfonodo	Sim	Pulmão e SNC	Misto (blastoma/epitelia)	Não	III	Intermediário		SIM	SIM			

SJV R	4	M	Não	-	Sim	Pulmão	Misto	Não	II	Intermediário		SIM	SIM	
CSS	7	F	Não	-	Não	-	Misto	Não	I	Intermediário	SIM	SIM	SIM	
EOA	4	F	Não	-	Não	-	Misto (blaste ma/epi télío)	Não	I	Intermediário	SIM	SIM	SIM	
FOS P	4	M	Não	-	Não	-	Misto	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	SIM	SIM
JGA SJ	3	M	Não	-	Não	-	Misto	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	SIM	SIM
JAR NN	4	M	Não	-	Não	-	Misto	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	SIM	
ASC	9	F	Não	-	Não	-	Blaste ma	Não	III	Alto risco		SIM	SIM	
IAS	4	F	Sim	Linfonod o/pulmã o	Não	-	Misto	Sim	III	Alto risco		SIM	SIM	
LSA	2	F	Não	-	Não	-	Misto	Sim	II	Alto risco		SIM	SIM	
LCG M	2	M	Não	-	Não	-	Misto	Sim	I	Alto risco		SIM	SIM	
MVN A	6	M	Não	-	Não	-	Misto	Sim	II	Alto risco		SIM	SIM	
MES S	7	F	Não	-	Não	-	Misto	Sim	II	Alto risco		SIM	SIM	

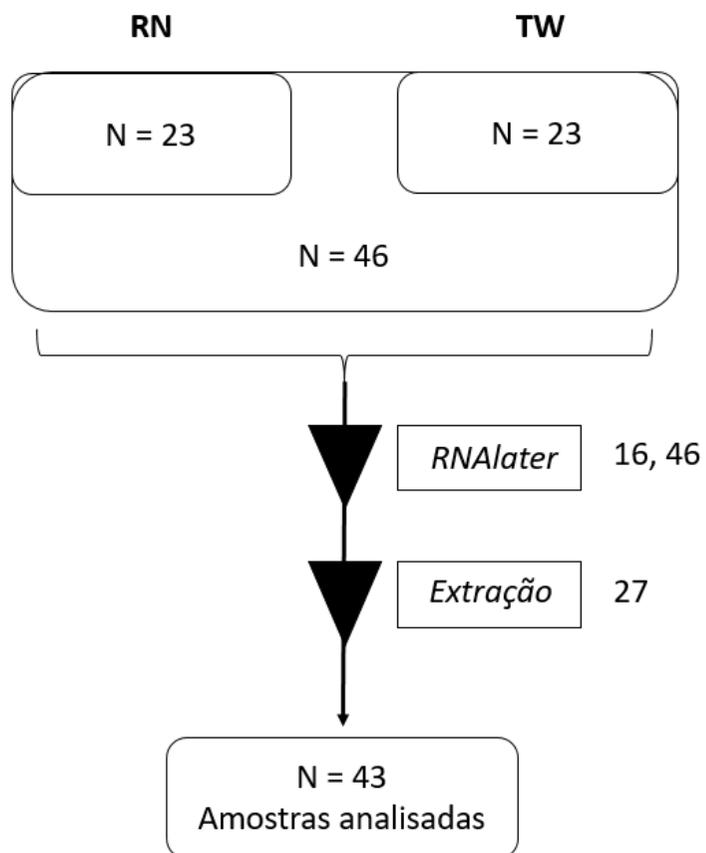
PDF PM	13	M	Sim	Retrope ritônio	Não	-	Blaste ma	Não	II	Alto risco	SIM	SIM	
YSF	3	M	Não	-	Não	-	Blaste ma	Não	II	Alto risco	SIM	SIM	
BAB	3	M	Sim	Retrope ritônio	Não	-	Anapla sia difusa	Sim	II	Alto risco	SIM	SIM	
TPN	4	F	Sim	Omento/ linfonod o	Não	-	Blaste ma	Sim	III	Alto risco	SIM	SIM	SIM
ACD M	1	F	Não	-	Não	-	Misto	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	
ABR S	8 meses	F	Não	-	Não	-	Epiteli al	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	
AFF A	1	M	Sim	Linfonod o	Não	-	Misto	Não	III	Intermediário	SIM	SIM	
BRM	3	M	Não	-	Não	-	Blaste ma	Não	II	Alto risco	SIM	SIM	
DBP	3	M	Sim	Pulmão	Não	-	Misto	Não	IV	Intermediário	SIM	SIM	
EMR N	1	F	Não	-	Não	-	regres sivo (viável: misto)	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	SIM
HOS	2	M	Não	-	Sim	Fígado	Estrom al	Não	I	Intermediário	SIM	SIM	

JRE	4	M	Não	-	Não	-	Estromal	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	
JCS	4	F	Não	-	Não	-	Misto	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	SIM
KSR	3	M	Não	-	Não	-	Misto	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	
EMO	1	F	Não	-	Não	-	Regressivo (viável: blastema/epitélio)	Não	III	Intermediário	SIM	SIM	SIM
JPJ	3	F	Não	-	Não	-	Regressivo (viável: blastema)	Não	I	Intermediário	SIM	SIM	
LVP	5	F	Não	-	Não	-	Misto	Não	I	Intermediário	SIM	SIM	
LSMS	4	F	Não	-	Não	-	Blastema	Não	II	Alto risco	SIM	SIM	
MFM	1	F	Não	-	Não	-	Regressivo (viável: misto)	Não	I	Intermediário	SIM	SIM	
MSS	3	M	Não	-	Não	-	Misto	Não	II	Intermediário	SIM	SIM	
TCM	12	M	Não	-	Não	-	Misto	Não	III	Intermediário	SIM	SIM	

TDS	8 meses	F	Não	-	Não	-	Regre ssivo	Não	I	Intermediário	SIM
THL SP	4	M	Não	-	Não	-	Misto	Não	I	Intermediário	SIM
VCB	2	M	Sim	Linfonod o/pulmã o	Não	-	Misto	Não	III	Intermediário	SIM
WBP S	4	M	Sim	Fígado	Não	-	Regre ssivo (viável: epitélio /blaste ma)	Não	III	Intermediário	SIM

Legenda: M = masculino, F = feminino

**ANEXO 3: FLUXO DE SELEÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NAS ANÁLISES DO METABOLOMA E CORRESPONDÊNCIA ENTRE OS PARES DE AMOSTRAS RN E TW**



RN	TW
1	24
2	25
3	26
4	27
5	28
6	29
7	30
8	31
9	32
10	33
11	34
12	35
13	36
14	37
15	38
16	39
17	40
18	41
19	42
20	43
21	44
22	45
23	46

**ANEXO 4: DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DOS CASOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DO METABOLOMA DESCRITAS NO CAPÍTULO 2.**

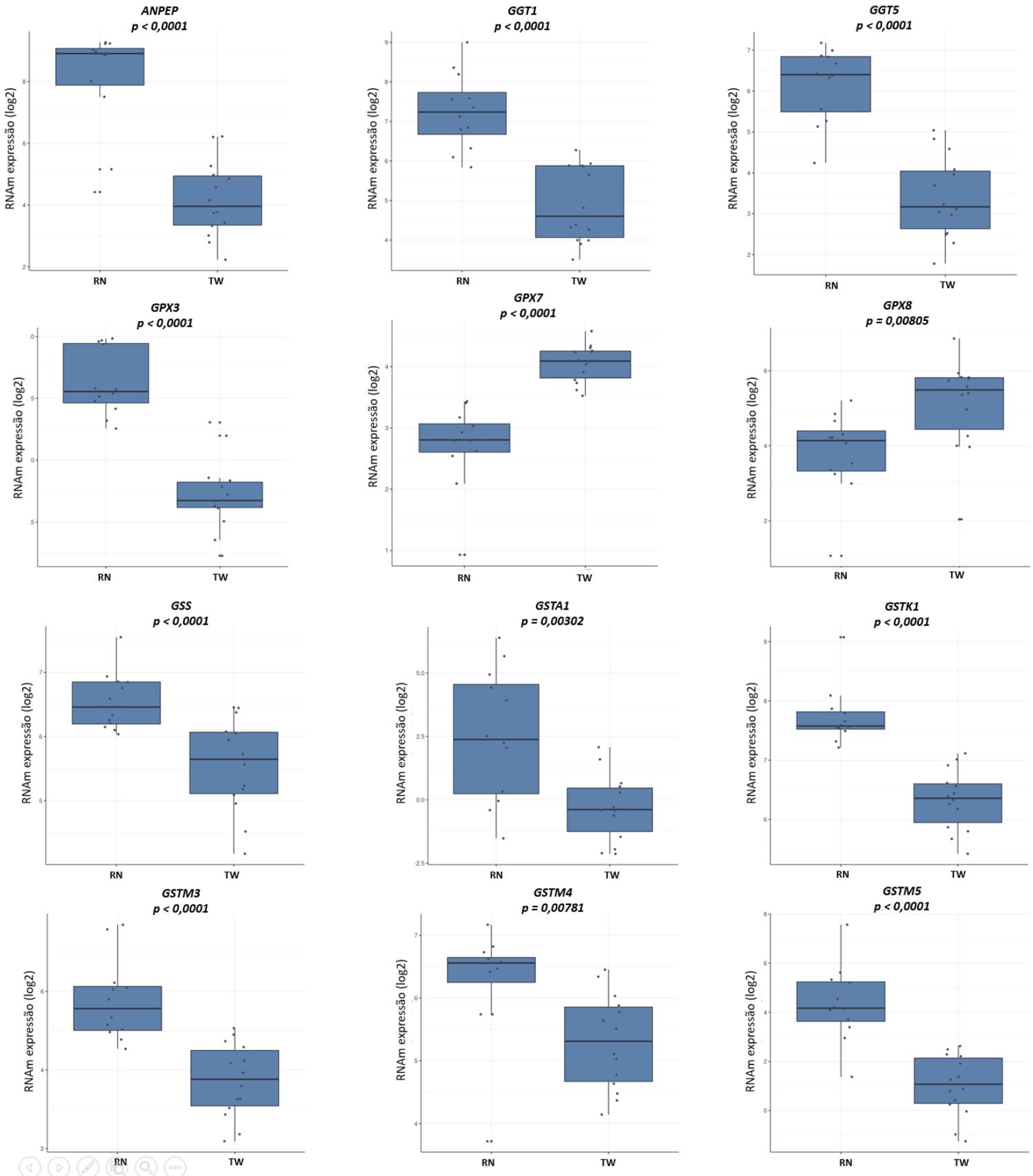
<b>ID Amostra</b>	<b>Classificação do tecido</b>	<b>Idade ao Diagnóstico (anos)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Metástase ao Diagnóstico</b>	<b>Local de metástase ao diagnóstico</b>	<b>Recidência</b>	<b>Local da metástase (recidência)</b>	<b>Revisão patológica</b>	<b>Estadiamento Patológico</b>	<b>Classificação de risco</b>
1	RN	9	F	Não	-	Não	-	Córtex	III	Alto
2	RN	3	M	Não	-	Não	-	Córtex	II	Alto
3	RN	7	F	Não	-	Não	-	Córtex	I	Intermediário
4	RN	3	M	Não	-	Não	-	Córtex	II	Intermediário
5	RN	4	M	Não	-	Não	-	Córtex	II	Intermediário
6	RN	4	F	Não	-	Não	-	Córtex	II	Intermediário
7	RN	3	M	Não	-	Não	-	Córtex	II	Intermediário
8	RN	5	F	Não	-	Não	-	Córtex	I	Intermediário
9	RN	4	F	Não	-	Não	-	Córtex	II	Alto
10	RN	2	F	Não	-	Não	-	Córtex	II	Alto
11	RN	2	M	Não	-	Não	-	Córtex	I	Alto
12	RN	6	M	Não	-	Não	-	Córtex	II	Alto
13	RN	4	F	Sim	Omento; linfoNódo	Não	-	Córtex	III	Alto
14	RN	4	M	Não	-	Não	-	Córtex	I	Intermediário
15	RN	2	M	Sim	LinfoNódo; pulmão	Não	-	Córtex	III	Intermediário
16	RN	2	F	Sim	LinfoNódo	Sim	Pulmão	Córtex	III	Alto

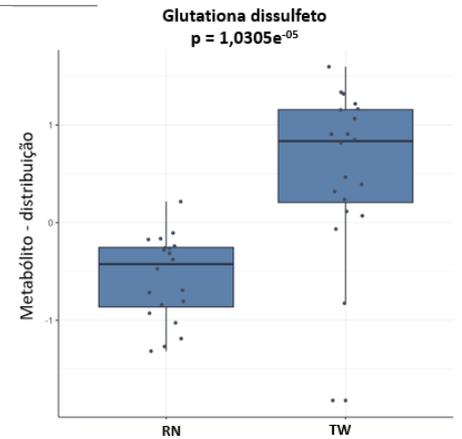
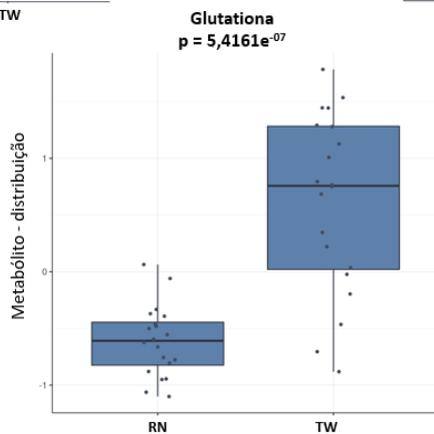
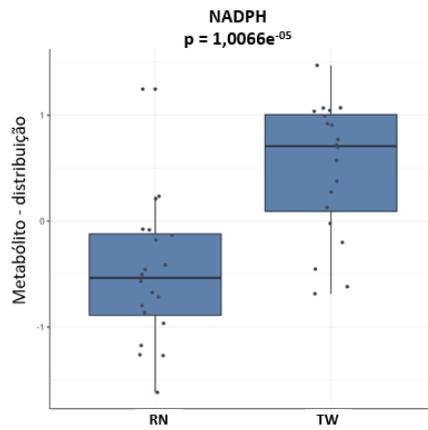
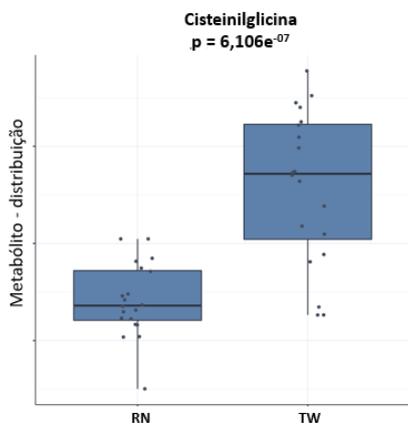
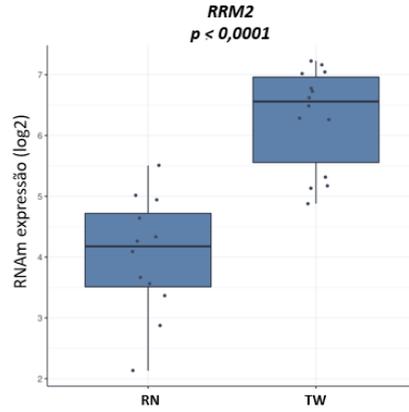
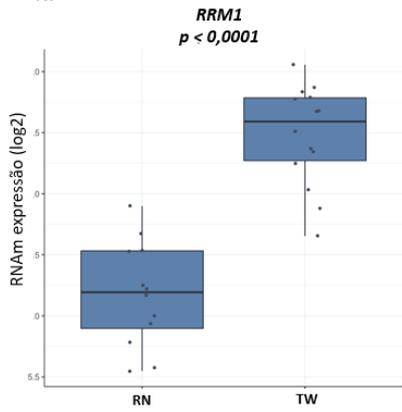
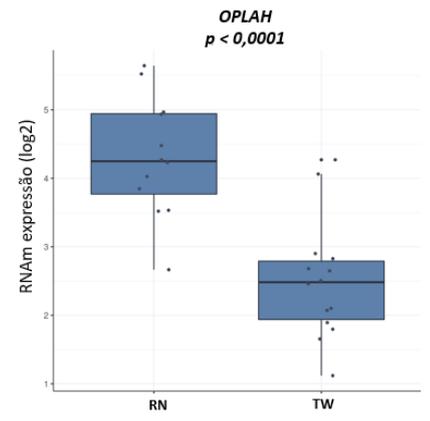
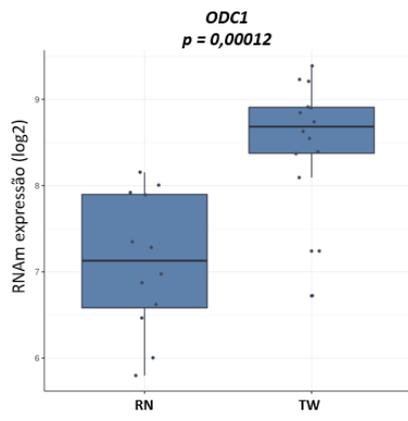
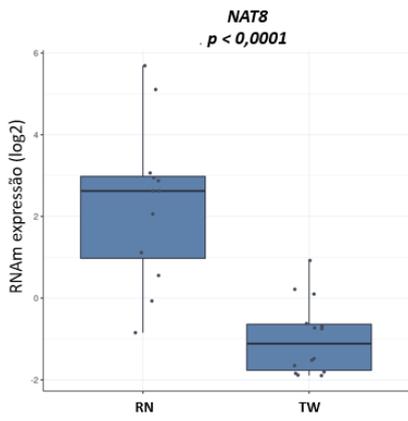
17	RN	6	M	Não	-	Sim	Lobo superior do pulmão	Córtex	I	Intermediário
18	RN	3	F	Não	-	Sim	Pulmão	Córtex	II	Intermediário
19	RN	2	M	Sim	LinfoNáodo	Sim	Pulmão	Córtex	III	Intermediário
20	RN	3	M	Não	-	Sim	Pulmão	Córtex	I	Intermediário
21	RN	9	M	Não	-	Sim	Lobo inferior do pulmão	Córtex	I	Intermediário
22	RN	4	M	Sim	LinfoNáodo	Sim	Pulmão, SNC	Córtex	III	Alto
23	RN	4	M	Não	-	Sim	Pulmão	Córtex	II	Intermediário
24	TW	9	F	Não	-	Não	-	Blastema 100%	III	Alto
25	TW	3	M	Não	-	Não	-	Blastema 70%, estroma 20%, epitélio 10%	II	Alto
26	TW	7	F	Não	-	Não	-	Blastema 1%, estroma 19%, epitélio 80%	I	Intermediário
27	TW	3	M	Não	-	Não	-	Blastema 45%, estroma 10%, epitélio 45%	II	Intermediário
28	TW	4	M	Não	-	Não	-	Blastema 35%, estroma 10%, epitélio 55%	II	Intermediário

<b>29</b>	TW	4	F	Não	-	Não	-	Blastema 40%, estroma 40%, epitélio 20%	II	Intermediário
<b>30</b>	TW	3	M	Não	-	Não	-	Blastema 30%, estroma 40%, epitélio 30%	II	Intermediário
<b>31</b>	TW	5	F	Não	-	Não	-	Blastema 10%, estroma 20%, epitélio 70%	I	Intermediário
<b>32</b>	TW	4	F	Não	-	Não	-	Blastema 90%, epitélio 10%	II	Alto
<b>33</b>	TW	2	F	Não	-	Não	-	Blastema 50%, estroma 40%, epitélio 10%	II	Alto
<b>34</b>	TW	2	M	Não	-	Não	-	Blastema 80%, estroma 10%, epitélio 10%	I	Alto
<b>35</b>	TW	6	M	Não	-	Não	-	Blastema 30%, estroma 30%, epitélio 40%	II	Alto
<b>36</b>	TW	4	F	Sim	Omento; linfoNãodo	Não	-	Blastema 100%	III	Alto
<b>37</b>	TW	4	M	Não	-	Não	-	Sem lâminas disponíveis	I	Intermediário

38	TW	2	M	Sim	LinfoNódo; pulmão	Não	-	Blastema 40%, estroma 20%, epitélio 40%	III	Intermediário
39	TW	2	F	Sim	LinfoNódo	Sim	Pulmão	Blastema 80%, estroma 5%, epitélio 15%	III	Alto
40	TW	6	M	Não	-	Sim	Lobo superior do pulmão	Blastema 5%, estroma 50%, epitélio 45%	I	Intermediário
41	TW	3	F	Não	-	Sim	Pulmão	Blastema 40%, estroma 30%, epitélio 30%	II	Intermediário
42	TW	2	M	Sim	LinfoNódo	Sim	Pulmão	Blastema 40%, estroma 30%, epitélio 30%	III	Intermediário
43	TW	3	M	Não	-	Sim	Pulmão	Blastema 25%, estroma 35%, epitélio 40%	I	Intermediário
44	TW	9	M	Não	-	Sim	Lobo inferior do pulmão	Blastema 0%, estroma 60%, epitélio 40%	I	Intermediário
45	TW	4	M	Sim	LinfoNódo	Sim	Pulmão, SNC	Blastema 80%, epitélio 20%	III	Alto
46	TW	4	M	Não	-	Sim	Pulmão	Blastema 40%, estroma 30%, epitélio 30%	II	Intermediário

# ANEXO 5: DADOS DE EXPRESSÃO DOS GENES E METABÓLITOS IDENTIFICADOS PELAS ANÁLISES DE INTEGRAÇÃO DO METABOLOMA E TRANSCRIPTOMA ENTRE TW E RN.





## RESEARCH

## Open Access



# Association between long interspersed nuclear element-1 methylation levels and relapse in Wilms tumors

Bruna M. de Sá Pereira<sup>1,5</sup>, Rafaela Montalvão-de-Azevedo<sup>1,5</sup>, Paulo Antônio Faria<sup>2</sup>, Neimar de Paula Silva<sup>1,5</sup>, Pedro Nicolau-Neto<sup>3</sup>, Mariana Maschietto<sup>4</sup>, Beatriz de Camargo<sup>5†</sup> and Sheila Coelho Soares Lima<sup>3\*†</sup> 

**Abstract**

**Background:** Wilms tumor (WT) is a curable pediatric renal malignancy, but there is a need for new molecular biomarkers to improve relapse risk-directed therapy. Somatic alterations occur at relatively low frequencies whereas epigenetic changes at 11p15 are the most common aberration. We analyzed long interspersed element-1 (LINE-1) methylation levels in the blastemal component of WT and normal kidney samples to explore their prognostic significance.

**Results:** WT samples presented a hypomethylated pattern at all five CpG sites compared to matched normal kidney samples; therefore, the averaged methylation levels of the five CpG sites were used for further analyses. WT presented a hypomethylation profile (median 65.0%, 47.4–73.2%) compared to normal kidney samples (median 71.8%, 51.5–77.5%;  $p < 0.0001$ ). No significant associations were found between LINE-1 methylation levels and clinical-pathological characteristics. We observed that LINE-1 methylation levels were lower in tumor samples from patients with relapse (median methylation 60.5%) compared to patients without relapse (median methylation 66.5%;  $p = 0.0005$ ), and a receiving operating characteristic curve analysis was applied to verify the ability of LINE-1 methylation levels to discriminate WT samples from these patients. Using a cut-off value of 62.71% for LINE-1 methylation levels, the area under the curve was 0.808, with a sensitivity of 76.5% and a specificity of 83.3%. Having identified differences in LINE-1 methylation between WT samples from patients with and without relapse in this cohort, we evaluated other prognostic factors using a logistic regression model. This analysis showed that in risk stratification, LINE-1 methylation level was an independent variable for relapse risk: the lower the methylation levels, the higher the risk of relapse. The logistic regression model indicated a relapse risk increase of 30% per decreased unit of methylation (odds ratio 1.30; 95% confidence interval 1.07–1.57).

**Conclusion:** Our results reinforce previous data showing a global hypomethylation profile in WT. LINE-1 methylation levels can be suggested as a marker of relapse after chemotherapy treatment in addition to risk classification, helping to guide new treatment approaches.

**Keywords:** Wilms tumor, LINE-1, Hypomethylation, Relapse

\* Correspondence: sheilacoelho@gmail.com

†Equal contributors

<sup>3</sup>Molecular Carcinogenesis Program, Research Center (CPQ), Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rua André Cavalcanti 37, Centro, Rio de Janeiro 20231-050, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Background

Renal tumors represent 5 to 10% of tumors in childhood, with approximately 93% of these being Wilms tumors (WTs) [1]. In Brazil, the annual incidence rate is approximately 9.4 cases per million [2]. WT is highly curable, with a survival rate of 90% [3], although a subset of patients present with tumor relapse (15–20%); in these cases, overall survival decreases to 50–60% [4]. Currently, two therapeutic approaches are used to treat WT; both present the same survival and relapse rates, differing only in the classification of risk factors. According to The Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP) protocol, patients receive preoperative chemotherapy whereas in the Children's Oncology Group protocol, patients undergo surgery as the initial treatment. Risk classification is largely based on tumor stage and histology and is used to guide clinical management [5]. Pre-treated WTs with predominance of the blastemal component classify the patients as high risk [6].

Currently, efforts have been made to identify molecular alterations to be implemented as biomarkers to improve risk stratification. Loss of heterozygosity of both 1p/16q in chemotherapy-naïve tumors and gain of 1q in treated and chemotherapy-naïve tumors have been associated with an increased risk of relapse/death and were suggested to be incorporated into clinical decisions [7–9].

A remarkable characteristic of WT is its relatively low frequency of somatic mutations, detected in only 30% of the cases, while epigenetic alterations such as loss of imprinting on chromosome 11p15 are observed in 70% of cases [10]. Considering the methylated cytosines as determined by high-performance liquid chromatography, most WTs are hypomethylated compared to adult tissues, although a considerable proportion (49%) have no alteration or moderate hypomethylation, without association with tumor stage [11]. Considering CpG site methylation levels, WTs present a hypomethylation profile compared to matched nephrogenic rests and normal kidneys [12], with specific CpG islands presenting hypermethylation [11, 13]. Genome-wide methylation analyses also have identified three differentially methylated regions (DMRs) capable of correctly distinguishing tumors from normal kidney tissues with a sensitivity of 98% and revealed a significant difference in methylation levels between intermediate and high-risk WT. Given the high prevalence of the DMRs (present in 112/120 WTs examined), these authors presented a pilot study in which DMR-2 could be detected in the circulation of patients with WT, showing potential for clinical utility [14].

The long interspersed element-1 (LINE-1) sequences are retrotransposon elements comprising ~17% of the human genome, and some of them still retain the capacity to retrotranspose themselves to new genomic locations [15]. LINE-1 is expected to be methylated in

normal tissues but presents decreased methylation levels in cancers [16–19], usually related to genomic instability and poor prognosis [16, 20]. In WTs, lower LINE-1 methylation levels have been linked to telomere shortening compared to normal kidneys, without a reported association with clinical data due to the small sample size [21].

In this study, LINE-1 methylation levels were analyzed in WT and kidney samples and explored in the context of identifying current prognostic parameters.

## Methods

### Patients and samples

This study included 47 patients with sporadic, unilateral, and localized WT (without association with congenital anomalies) who were diagnosed and treated according to the SIOP WT 2001 protocol [3] between 2003 and 2014 at the Pediatric Department of Instituto Nacional do Cancer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil. All samples were formalin-fixed, embedded in paraffin (FFPE), and stored in the pathology division of INCA. New hematoxylin–eosin-stained slides were reviewed by a pathologist (PAF), who defined viable areas of blastemal component and normal renal cortex tissues. For this study, we selected only the blastemal component of the tumor ignoring other components and overall histological classification for molecular analysis. However, histology was used for risk assessment and tumors were classified according to SIOP guidelines as intermediate or high risk [22]. The presence of anaplasia was not considered because it was very rare (six cases) and not selected as an area for DNA extraction. This study was approved by the Research Ethics Committee of INCA, number 131/13, and informed consent was signed by the children's guardians.

### DNA extraction and quantification

Two punches (1 mm diameter each) from selected regions were used for DNA extraction using the QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. DNA quantity and purity were assessed by spectrophotometry (Nanodrop).

### LINE-1 methylation analysis

A total of 500 ng of DNA was converted using the EpiTect Plus Bisulfite Conversion kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Briefly, ~50 ng of bisulfite-treated DNA was used as template for a PCR with LINE-1 primers (forward: 5'-biotin-TAGG-GAGTGTAGATAGTGG and LINE-1-reverse 5'-AACTCCCTAACCCTTAC) and Platinum Taq DNA polymerase (INVITROGEN). Cycling conditions included an initial denaturation at 95 °C for 15 min, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 40 s, annealing at 56 °C for 40 s, and extension at

72 °C for 40 s. A final extension step at 72 °C for 10 min was performed. PCR products were then pyrosequenced using the sequencing primer 5'-AACTCCC-TAACCCCTTAC in the Pyromark Q96 ID (QIAGEN), following the manufacturer's instructions. Efficiency of bisulfite conversion was verified using nonCpG cytosine residues as built-in controls.

The pyrosequencing method treats each CpG site as a C/T polymorphism and generates quantitative data (in percentage) of the relative ratio of the methylated allele versus the non-methylated allele. The heights of the peaks given by the pyrograms were converted into numerical values (Additional file 1: Figure S1). Methylation levels of the five CpG sites were averaged, and a single value was analyzed for each sample [23].

#### Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). First, all groups were analyzed for normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test), and if different sample groups followed normal distribution, *t* tests (paired and unpaired) were used; otherwise, the Wilcoxon matched-pairs test was used in the case of paired samples (WT versus kidney), and the Mann–Whitney test was used for unpaired samples. For comparisons with more than two groups, we used the Kruskal–Wallis test with Tukey's multiple comparison post-test correction.

A receiver operating characteristic (ROC) curve was created to determine the LINE-1 methylation level threshold that could discriminate cases with relapse from those without relapse. To analyze the relation between prognostic factors as well as LINE-1 methylation

levels and relapse, odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated by unconditional logistic regression analysis using SPSS version 21.0 (IBM). All differences were considered statistically significant if  $p < 0.05$ .

## Results

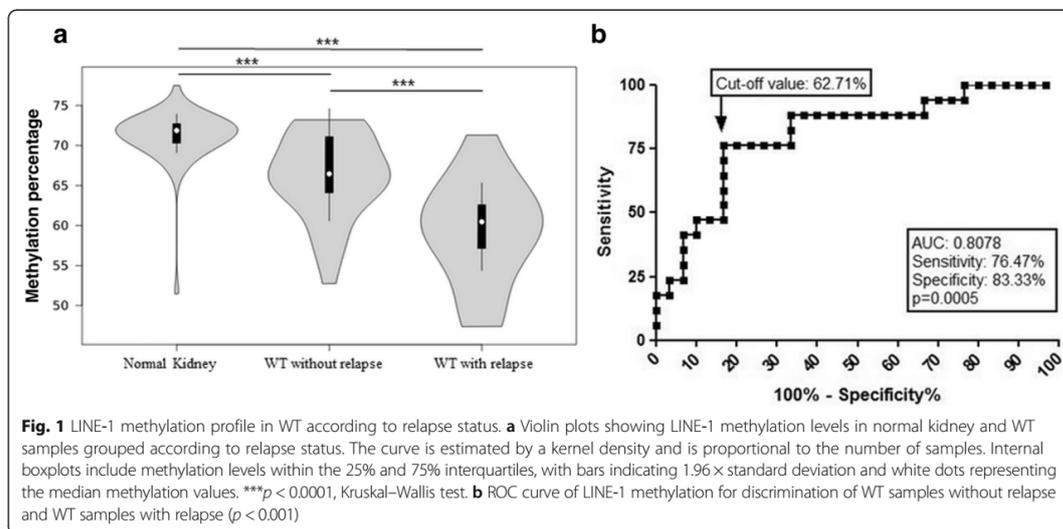
### Hypomethylation of LINE-1 in WTs

We analyzed 47 FFPE WTs and normal kidney paired samples. There were 31 and 16 patients classified as intermediate and high risk, respectively, among which 17 experienced relapse.

Methylation levels of five CpG sites located in the LINE-1 sequence were evaluated by pyrosequencing in matched WT blastemal component and renal cortex tissues. WT samples presented a hypomethylated pattern in all five CpG sites compared to matched kidney samples; therefore, the averaged methylation levels of the five CpG sites were used for further analyses. WT presented a hypomethylation profile (median 65.0%, 47.4–73.2%) compared to normal kidney samples (median 71.8%, 51.5–77.5%;  $p < 0.0001$ ) (Fig. 1a).

### Association of LINE-1 hypomethylation with clinical and tumor characteristics

No significant associations were found between LINE-1 methylation levels and clinical–pathological characteristics including age at diagnosis, gender, risk classification, and tumor stage (Table 1). Also, although the presence of anaplasia was not considered for our analysis, we analyzed LINE-1 methylation levels in tumor samples with and without anaplasia. WT samples that had anaplasia (focal or diffuse) showed a lower global methylation level



**Table 1** Associations between LINE-1 methylation levels and clinical-pathological characteristics

Characteristic	Group	N (%)	LINE-1 methylation, median in % (25th–75th percentiles)	p value
Gender	Male	28 (59.6)	65.11 (58.66–67.09)	0.978
	Female	19 (40.4)	64.06 (58.54–71.21)	
Age at diagnosis	0–< 2 years	14 (29.8)	66.47 (64.50–71.23)	0.258
	2–5 years	24 (51.0)	63.40 (58.32–67.17)	
	> 5 years	9 (19.2)	61.28 (56.80–67.74)	
Stage	I	11 (23.4)	62.59 (57.12–66.27)	0.281
	II	20 (42.6)	64.80 (58.45–69.87)	
	III	16 (34.0)	65.00 (63.14–71.28)	
Risk classification	Intermediate	31 (66.0)	65.23 (60.46–68.38)	0.229
	High	16 (44.0)	61.66 (57.35–67.27)	

compared to samples without anaplasia; those presenting diffuse anaplasia had even lower LINE-1 methylation levels (Additional file 2: Table S1). No further analysis was performed regarding the presence of anaplasia because of the low number of cases (six cases).

We observed that LINE-1 methylation levels were lower in tumor samples from patients with relapse (median methylation 60.5%) compared to patients without relapse (median methylation 66.5%;  $p = 0.0005$ ) (Fig. 1a). To explore this result further, a ROC curve analysis was applied to verify the ability of LINE-1 methylation levels to discriminate WT samples from these patients. Using a cut-off value of 62.71% for LINE-1 methylation levels, the area under the curve was 0.808, with a sensitivity of 76.5% and a specificity of 83.3% ( $p = 0.0005$ ; Fig. 1b).

Given that we found a difference in LINE-1 methylation levels between WT samples from patients with and without relapse in this cohort, thus we applied the uni- and multivariate analyses with other prognostic factors (stage and histological risk classification) as an exploratory question. We observed an association between high-risk classification and decreased LINE-1 methylation levels with a higher risk of relapse when we performed a univariate analysis (Fig. 2a). Hence, we applied a multivariate analysis to evaluate LINE-1 methylation levels regarding the established prognostic factors (stage and risk classification). This analysis showed that risk stratification, as expected, as well as LINE-1 methylation levels were independent variables for risk of relapse: the lower the methylation levels, the higher the risk of relapse. The logistic regression model highlighted an increase of 30% in risk of relapse per decreased unit of methylation (OR 1.30; 95% CI 1.07–1.57; Fig. 2b). In other words, a decrease of 1% in the percentage of methylated cells measured by pyrosequencing is associated with an increase of 30% in relapse risk.

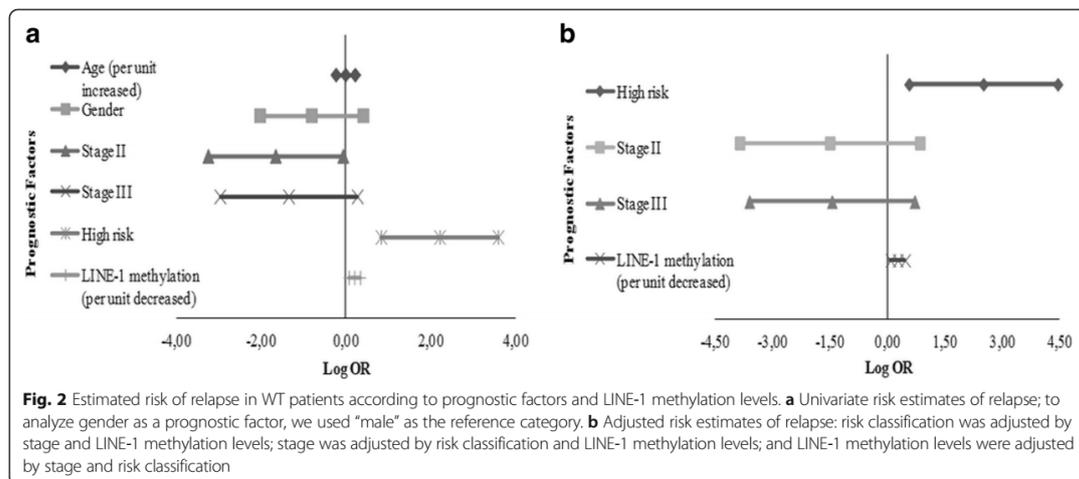
## Discussion

Although WT is a curable disease, a considerable number of patients experience relapse. Thus, a refinement in

the risk stratification for patients with WT could help avoiding overtreatment, improve survival chances, and reduce morbidity. Risk classification from a SIOP-2001 clinical trial is based on tumor response to chemotherapy, with blastemal component predominance classifying patients in the high-risk group [24]. However, such risk stratification has its flaws and could benefit from the addition of molecular markers of relapse. These flaws in risk stratification include central pathology review and lack of inclusion of tumor volume, with evaluation only of percent of residual cell type. Hence, a current SIOP-2001 study is evaluating if a threshold of 20–50 ml of remaining blastemal cells can be used as a new stratifying biomarker [25, 26]. However, we could not evaluate the residual blastemal volume retrospectively in this cohort.

LINE-1 serves as a surrogate marker of global methylation, and several studies have demonstrated the impact of its methylation levels on the prognosis of patients with cancer [27], such as colon [28], gastric [29], and hepatocellular [30] cancers. We observed lower LINE-1 methylation levels in tumor compared to matched normal kidney samples; however, no differences were observed when comparing the blastemal components from high- and intermediate-risk samples. Nevertheless, tumor samples from patients who experienced relapse showed lower LINE-1 methylation levels compared to tumor samples from patients without relapse. These data suggest that LINE-1 methylation levels represent a candidate biomarker of relapse for patients with WT.

Global hypomethylation has been observed in embryonal solid tumors [31, 32]. In WT, global hypomethylation in two satellite regions, satellite  $\alpha$  and satellite 2, was reported as a surrogate marker of global methylation in all histological types [33]. Lower LINE-1 methylation levels also are associated with telomere shortening in WT compared to normal kidney samples [21]. Altogether, global DNA hypomethylation seems to be a common feature in WT [12, 21, 33], independently of



the marker used or whether preoperative chemotherapy or surgery was the initial treatment. These lower methylation levels not only may be a consequence of the tumorigenesis process but also may actively contribute to tumor development and/or progression. Global DNA hypomethylation is associated with genomic instability of transposons and retrotransposons, as well as with activation of oncogenes [34, 35]. Therefore, it is not surprising that lower global methylation levels are often associated with poor prognosis in different tumor types [14] including the embryonal medulloblastomas [36] and hepatoblastomas [32, 37].

Survival rates for WT-relapsed patients may reach only 50% even under aggressive treatment [4]. Thus, factors that can predict relapse may help standardize treatment so that a more conservative approach could be applied to reduce morbidity for patients with a lower risk of relapse. For those patients with a higher relapse risk, alternative treatments must be proposed because the current therapeutic approaches reach the limits of toxicity. In patients with surgery as a first treatment, 11p15 LOI has been proposed as a biomarker for relapse in patients with stage I favorable histology WT [38, 39], while loss of heterozygosity on 11p15 was associated with a risk of recurrence of 5.00 [9]. Furthermore, a study evaluating the prognostic significance of different molecular markers (including 1q gain, 1p and 16q losses, and *MYCN* gain) in a large case series (586) of WT showed that, besides tumor stage and high-risk histology, only 1q gain is an independent predictor of event-free survival [7]. Our data showed that LINE-1 methylation levels could distinguish tumor samples from patients with and without relapse with a sensitivity of 76.5% and a specificity of 83.3%, remaining as an independent prognostic factor for relapse on top of the histological

risk classification. In this cohort, the high-risk patients were classified solely based on the remaining proportion of the blastemal component (after excluding necrosis). This enrichment for blastemal cells, despite the histological risk classification, allows for comparison of all tumors with a lower influence of the cellular composition given by the different cells presented in the tumors. Therefore, it is tempting to propose that LINE-1 methylation could be a useful predictor of relapse, in addition to risk classification, helping to guide new treatment approaches. Finally, the turnover time of the analysis of approximately 10 days would enable the indication of patient's prognosis before postoperative treatment.

Our results reinforce previous data showing a global hypomethylation profile in WT. Also, we suggest a prospective evaluation to access the feasibility of the use of LINE-1 methylation levels as a possible marker of relapse after chemotherapy treatment. Although our findings are quite promising, the number of samples was limited, and the analyses were restricted to the blastemal cells of the tumors. Thus, other studies should be carried out to confirm the prognostic value of LINE-1 methylation in WT.

## Conclusions

Our results showed that the blastemal component of WT samples exhibits a LINE-1 hypomethylation pattern in comparison to normal kidney samples. In addition, these lower methylation levels not only may be a consequence of the tumorigenesis process but also may actively contribute to tumor development and/or progression. This association suggests that embryonal tumors are driven by different oncogenic mechanisms, as has been observed in other embryonal tumors. We also show that with each unit decrease in global methylation,

the chances of relapse increase, indicating the accuracy of this marker as a possible relapse predictor in association with the currently used risk classification (SIOP 2001). However, because of the small number of samples and the fact that these analyses were done only in the blastemal component, more studies need to evaluate prospectively the efficacy of this molecular marker.

### Additional file

**Additional file 1: Figure S1.** LINE-1 methylation pyrograms of representative samples. (A) Normal kidney; (B) Wilms tumor. Five CpG sites were evaluated in the LINE-1 promoter sequence. Arrows indicate internal controls for bisulfite conversion. (TIFF 416 kb)

**Additional file 2: Table S1.** Updated clinical data and methylation mean of the 5 LINE-1 sites of each patient. (DOCX 33 kb)

### Acknowledgements

The authors thank all of the parents and children who participated in this study.

### Funding

BMSP, RMA, NPS, and PNN have a scholarship from CAPES/MS; BDC has a scholar grant from CNPq 306291/2014-2; MM was supported by FAPESP 2015/06281-7.

### Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### Authors' contributions

All authors made substantial contributions to the conception and design and to the acquisition, analysis, or interpretation of the data: BDC, RMA, and BMSP designed the study; BMSP, RMA, PAF, and BDC selected the cases included in this study; and PAF, RMA, and BMSP performed pathological review of FFPE sections. BMSP extracted DNA and prepared samples for analysis, and all experiments were supervised by BDC, MM, and SCSL; BMSP performed bioinformatics analyses with help from SCSL, PNN, NPS, and MM; NPS, SCSL, MM, and BMSP prepared all figures and tables. BMSP, SCSL, MM, and BDC wrote the manuscript. All authors have read and approved the final version of this manuscript.

### Ethics approval and consent to participate

The protocol was approved by the Research Ethics Committee of INCA, number 131/13, and informed consent was signed by the children's guardians.

### Consent for publication

Consent for publication was obtained from all patients.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### Author details

<sup>1</sup>Post Graduate Program of Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil. <sup>2</sup>Pathology Division of Instituto Nacional do Câncer (DIPAT-INCA), Rua Cordeiro da Graça 156, Santo Cristo, Rio de Janeiro 20220-400, Brazil. <sup>3</sup>Molecular Carcinogenesis Program, Research Center (CPQ), Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rua André Cavalcanti 37, Centro, Rio de Janeiro 20231-050, Brazil. <sup>4</sup>Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Rua Giuseppe Máximo Scollaro 10.000, Bosque das Palmeiras, Campinas, Sao Paulo 13083-970, Brazil. <sup>5</sup>Pediatric Hematology-Oncology Research Program,

Research Center (CPQ), Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rua Andre Cavalcanti 37, Centro, Rio de Janeiro 20231-050, Brazil.

Received: 6 June 2017 Accepted: 30 November 2017

Published online: 12 December 2017

### References

- Pastore G, Znaor A, Spreafico F, Graf N, Pritchard-Jones K, Stelarova-Foucher E. Malignant renal tumours incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer*. 2006;42(13):2103-14.
- de Camargo B, de Oliveira Ferreira JM, de Souza Reis R, Ferman S, de Oliveira Santos M, Pombo-de-Oliveira MS. Socioeconomic status and the incidence of non-central nervous system childhood embryonic tumours in Brazil. *BMC Cancer*. 2011;11:160.
- Pritchard-Jones K, Bergeron C, de Camargo B, Van den Heuvel-Eibrink MM, Acha T, Godzinski J, et al: omission of doxorubicin from the treatment of stage II-III, intermediate-risk Wilms' tumour (SIOP WT 2001): an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*. 2015;386(9999):1156-64.
- Spreafico F, Pritchard Jones K, Malogolowkin MH, Bergeron C, Hale J, de Kraker J, et al. Treatment of relapsed Wilms tumors: lessons learned. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009;9(12):1807-15.
- Dome JS, Graf N, Geller JJ, Fernandez CV, Mullen EA, Spreafico F, et al. Advances in Wilms tumor treatment and biology: progress through international collaboration. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):2999-3007.
- Weirich A, Leuschner I, Harms D, Vujanic GM, Troger J, Abel U, et al. Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. *Ann Oncol*. 2001;12(3):311-9.
- Chagtai T, Zill C, Dainese L, Wegert J, Savola S, Popov S, et al. Gain of 1q as a prognostic biomarker in Wilms tumors (WTs) treated with preoperative chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 trial: a SIOP Renal Tumours Biology Consortium study. *J Clin Oncol*. 2016;34(26):3195-203.
- Gratias EJ, Dome JS, Jennings LJ, Chi YY, Tian J, Anderson J, et al. Association of chromosome 1q gain with inferior survival in favorable-histology Wilms tumor: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2016;34(26):3189-94.
- Cone EB, Dalton SS, Van Noord M, Tracy ET, Rice HE, Routh JC. Biomarkers for Wilms tumor: a systematic review. *J Urol*. 2016;196(5):1530-5.
- Scott RH, Murray A, Baskcomb L, Turnbull C, Loveday C, Al-Saadi R, et al. Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget*. 2012;3(3):327-35.
- Ehrlich M, Jiang G, Fiala E, Dome JS, MC Y, Long TI, et al. Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene*. 2002;21(43):6694-702.
- Charlton J, Williams RD, Sebire NJ, Popov S, Vujanic G, Chagtai T, et al. Comparative methylome analysis identifies new tumour subtypes and biomarkers for transformation of nephrogenic rests into Wilms tumour. *Genome Med*. 2015;7(1):11.
- Charlton J, Pavasovic V, Pritchard-Jones K. Biomarkers to detect Wilms tumors in pediatric patients: where are we now? *Future Oncol*. 2015; 11(15):2221-34.
- Charlton J, Williams RD, Weeks M, Sebire NJ, Popov S, Vujanic G, et al. Methylome analysis identifies a Wilms tumor epigenetic biomarker detectable in blood. *Genome Biol*. 2014;15(8):434.
- Hancks DC, Kazazian HH Jr. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob DNA*. 2016;7:9.
- Ardehjan D, Taylor MS, Ting DT, Burns KH. The human long interspersed Element-1 Retrotransposon: an emerging biomarker of neoplasia. *Clin Chem*. 2017;63(4):816-22.
- Barchitta M, Quattrocchi A, Maugeri A, Vinciguerra M, Agodi A. LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9(10):e109478.
- Jeyapalan JN, Doctor GT, Jones TA, Alberman SN, Tep A, Haria CM, et al. DNA methylation analysis of paediatric low-grade astrocytomas identifies a tumour-specific hypomethylation signature in pilocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):54.
- Kiss NB, Kogner P, Johnsen JJ, Martinsson T, Larsson C, Geli J. Quantitative global and gene-specific promoter methylation in relation to biological properties of neuroblastomas. *BMC Med Genet*. 2012;13:83.

20. Symer DE, Connelly C, Szak ST, Caputo EM, Cost GJ, Parmigiani G, et al. Human I1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell*. 2002;110(3):327–38.
21. Chang HB, Zou JZ, He C, Zeng R, Li YY, Ma FF, et al. Association between long interspersed nuclear Element-1 methylation and relative telomere length in Wilms tumor. *Chin Med J*. 2015;128(22):3055–61.
22. Vujanic GM, Sandstedt B. The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology approach. *J Clin Pathol*. 2010;63(2):102–9.
23. Vaissiere T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res*. 2009;69(1):243–52.
24. Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, Kelsey A, Leuschner I, de Kraker J, Committee SNS. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol*. 2002;38(2):79–82.
25. Graf N, van Tinteren H, Pritchard-Jones K, Bergeron C, Sandstedt B, Leuschner I, et al. Is the absolute blastema volume after preoperative chemotherapy in nephroblastoma relevant for prognosis? *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57(5):741–2.
26. Group SRTS. Paediatric renal tumours: perspectives from the SIOP-RTSG. *Nat Rev Urol*. 2017;14(1):3–4.
27. Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, et al. The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9(9):e106290.
28. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Chan AT, Schernhammer ES, et al. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(23):1734–8.
29. Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Murata A, Iwagami S, Miyake K, et al. LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastric Cancer*. 2013;16(4):480–7.
30. Harada K, Baba Y, Ishimoto T, Chikamoto A, Kosumi K, Hayashi H, et al. LINE-1 methylation level and patient prognosis in a database of 208 hepatocellular carcinomas. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(4):1280–7.
31. Gomez S, Castellano G, Mayol G, Sunol M, Queiros A, Bibikova M, et al. DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights. *Epigenomics*. 2015;7(7):1137–53.
32. Maschietto M, Rodrigues TC, Kashiwabara AY, Souza de Araujo ES, Marques Aguiar TF, Lima da Costa CM, et al. DNA methylation landscape of hepatoblastomas reveals arrest at early stages of liver differentiation and cancer-related alterations. *Oncotarget*. 2016; *in press*
33. Ludgate JL, Le Mee G, Fukuzawa R, Rodger EJ, Weeks RJ, Reeve AE, et al. Global demethylation in loss of imprinting subtype of Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(2):174–84.
34. Schulz WA. L1 retrotransposons in human cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2006;2006(1):83672.
35. Tubio JM, Li Y, YS J, Martincorena I, Cooke SL, Tojo M, et al. Mobile DNA in cancer. Extensive transduction of nonrepetitive DNA mediated by L1 retrotransposition in cancer genomes. *Science*. 2014;345(6196):1251343.
36. Hovestadt V, Remke M, Kool M, Pietsch T, Northcott PA, Fischer R, et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathol*. 2013;125(6):913–6.
37. Cui X, Liu B, Zheng S, Dong K, Dong R. Genome-wide analysis of DNA methylation in hepatoblastoma tissues. *Oncol Lett*. 2016;12(2):1529–34.
38. Perlman EJ, Grundy PE, Anderson JR, Jennings LJ, Green DM, Dome JS, et al. WT1 mutation and 11P15 loss of heterozygosity predict relapse in very low-risk Wilms tumors treated with surgery alone: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):698–703.
39. Sredni ST, Gadd S, Huang CC, Breslow N, Grundy P, Green DM, et al. Subsets of very low risk Wilms tumor show distinctive gene expression, histologic, and clinical features. *Clin Cancer Res*. 2009;15(22):6800–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



# Intra-tumor genetic heterogeneity in Wilms tumor samples

 Bruna M. de Sá Pereira<sup>1</sup>  
  Rafaela Montalvão de Azevedo<sup>1</sup>  
 Joaquim Caetano de Aguirre Neto<sup>2</sup>  
Clarice Franco Menezes<sup>3</sup>  
 Karla Emília Rodrigues<sup>4</sup>  
 Paulo A. Faria<sup>5</sup>  
 Beatriz de Camargo<sup>1</sup>  
 Mariana Maschietto<sup>6</sup>

1. Centro de Pesquisas (CPQ), Instituto Nacional de Câncer (Inca), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
2. Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brasil.
3. Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.
4. Hospital das Clínicas da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.
5. Divisão de Patologia (Dipat), Instituto Nacional de Câncer (Inca), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
6. Laboratório Nacional de Biotecnologia (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, Brasil.

<http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.65.12.1496>

### SUMMARY

Childhood renal tumors account for ~7% of all childhood cancers, and most cases are embryonic Wilms' tumors (WT). Children with WT are usually treated by either COG or SIOP. The latter treats the children using preoperative chemotherapy, but both have around 90% of overall survival in five years. WT is a genetically heterogeneous group with a low prevalence of known somatic alterations. Only around 30% of the cases present mutation in known genes, and there is a relatively high degree of intra-tumor genetic heterogeneity (ITGH). Besides potentially having an impact on the clinical outcome of patients, ITGH may interfere with the search for molecular markers that are prospectively being tested by COG and SIOP. In this review, we present the proposal of the current UMBRELLA SIOP Study 2017/Brazilian Renal Tumor Group that requires the multi-sampling collection of each tumor to better evaluate possible molecular markers, as well as to understand WT biology.

KEYWORDS: Wilms tumor. Biomarkers. Genetic Heterogeneity

### INTRODUCTION

Childhood renal tumors account for ~7% of all childhood cancers, and most cases are Wilms tumors (WT) or nephroblastomas (~90%), affecting one in 10,000 children under the age of fifteen<sup>1</sup>. It is estimated there are 500 new cases of WT every year in Brasil, with a median age-adjusted incidence rate

of 9.5 cases per million<sup>2</sup>. The peak incidence is between the ages of 2 and 3 years<sup>1</sup>, but bilateral cases and those associated with congenital syndromes (5 to 10% of the cases) are diagnosed earlier<sup>3</sup>.

Non-WT renal tumors include clear cell sarcoma of the kidney (CCSK, 2-3%, 1% of the cases), with

DATE OF SUBMISSION: 04-Apr-2019  
DATE OF ACCEPTANCE: 18-Jun-2019  
CORRESPONDING AUTHOR: Mariana Maschietto  
Instituto de Pesquisa, Hospital Infantil Boldrini, Campinas, SP, Brasil  
Rua Dr. Gabriel Porto, 1270 - Cidade Universitária, Campinas - SP, 13083-210  
Email: marianamasc@gmail.com

similar age presentation to WT, malignant rhabdoid tumor of the kidney (MRTK, 2-3%, 1% of the cases), which presents a peak incidence at 10 to 18 months, renal cell carcinoma (RCC, 1% of the cases), with a peak incidence among adolescents, benign congenital mesoblastic nephroma (CMF, 2-3% of the cases), and all other renal tumors, which include sarcoma and neuroectodermal tumor of the kidney, comprise 2-3% of the cases<sup>4</sup>. All renal tumors, but CMF, which is usually treated with surgery alone, have a poorer prognosis compared to WT. Due to its relatively high incidence, this review will focus on WT.

Children with renal tumors are usually treated according to one of the two major clinical groups. The SIOP-RTSG (*Societe Internationale d'Oncologie Pediatric - Renal Tumor Study Group*) protocol recommends children be treated with pre-operative chemotherapy; and the COG (*National Wilms Tumor Study/Children's Oncology Group*) protocols advise children to be submitted to upfront surgery, with both reaching 90% of overall survival<sup>5,6</sup>.

#### GENETIC EVENTS AND POTENTIAL PROGNOSTIC MARKERS FOR WILMS TUMORS

Most pediatric tumors present a short time that precedes the diagnosis, thus resulting in fewer evolutionary events compared to adult cancers<sup>7</sup>. Consistently, the mutational spectrum described in most pediatric solid tumors has been considerably small, including in WT. WT is a genetically heterogeneous group that presents a low prevalence of known somatic alterations and a relatively high degree of Intra-Tumor Genetic Heterogeneity (ITGH)<sup>8,9</sup>. For instance, 30% of WT cases have a known mutated gene, with *WT1*, *CTNNA1*, and *AMER1* being the most prevalent<sup>10,11</sup>. Moreover, alterations in microRNA processor genes (*DROSHA*, *DGCR8*, *DICER1*, and *TARBP2*) and *SIX1/2* were also found in up to 15% of WT<sup>12-15</sup>. The mutation spectrum of WT was properly discussed by other studies<sup>4-11</sup>. For the purpose of this review, we considered of interest the somatic mutations in *TP53* found in ~70% of the diffuse anaplastic WT and gain of *MYCN* found in up to 4% of the cases. Diffuse anaplastic tumors comprise 5% of WT cases. They present an unstable genome, but tumors that also had *TP53* mutations or loss presented a higher number of copy number alterations<sup>14,16</sup>. In diffuse anaplastic WT, mutation/loss

in *TP53* was suggested to be an independent poor prognostic factor<sup>16</sup>. *MYCN* gain was associated with anaplasia and with poorer relapse-free and overall survival, independently of tumor histology<sup>17</sup>. A gain of 1q is found in up to 30% of WT cases and was considered a potential prognostic biomarker regardless of the treatment protocol (COG or SIOP). A gain of 1q was associated with poorer event-free and overall survival, and, if validated, it could be used to select patients who were first treated with surgery or chemotherapy for more aggressive treatment<sup>18-20</sup>.

Loss of heterozygosity (LOH) of both 1p and 16q were associated with lower event-free and overall survival in WT treated with surgery first<sup>21,22</sup>. Following these findings, for the first time, the presence of molecular alterations was used to direct therapy in WT. COG intensified the treatment for stage III/IV WT, with loss of heterozygosity (LOH) of 16q, and 1p significantly improving the event-free survival<sup>23</sup>.

All potential biomarkers discussed here were studied in a single sample from each case without considering the existence of ITGH in WT.

#### Intra-tumor genetic heterogeneity in Wilms Tumor: the importance of prognostic markers

WT develops from primitive renal cells incapable of completing kidney differentiation, which results in a tumor that recapitulates nephrogenesis, with morphology, methylation, and gene expression similar to the fetal kidney<sup>24-28</sup>. WT is composed of varying proportions of three morphologically distinct cell types: undifferentiated blastemal cells, epithelial cells ordered into primitive structures, and stromal cells, which are related to the clinical behavior<sup>29,30</sup>.

Intratumoral diversity is relatively common in chemotherapy-treated primary childhood cancers, even for WT that usually is described as presenting a relatively stable genome. Most WT subclones have low-frequency aberrations, but potential drivers may emerge as part of the ITGH, such as copy number neutral imbalance of 11p and trisomy 8, 1q gain, and 1p/16q loss<sup>9</sup>.

The gain of 1q is a promising biomarker for patients with WT stratification into risk groups, although it can be an early or late event. In the latter scenario, for prospective studies that underlie clinical trials, the assessment of the ITGH by multisampling the tumor for proper evaluation of this biomarker is of utmost importance. Based on an analysis of 20

cases of WT, it was estimated the need for at least three tumor samples for each case<sup>31</sup>.

Other alterations were characterized as ITGH in WT, such as *AMER1* (*WTX*)<sup>32</sup>, *DROSHA*, *SIX1*<sup>33</sup>, and *TP53*<sup>34</sup>. These studies are still in early stages, and definitive interpretation and conclusion will only be possible after studying large multi-sampled tumor cohorts.

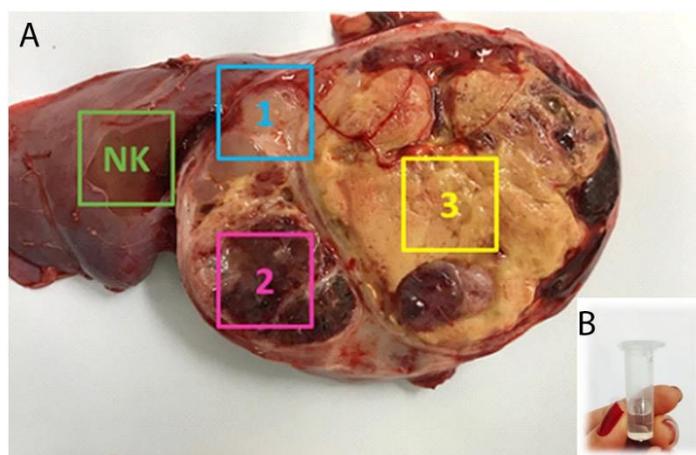
#### Proposal of the current SIOP protocol/ Brazilian Renal Tumor Group

There is an increasing effort to identify prognostic molecular markers for patients with WT. The current approach to risk stratification has reached the limits of what can be achieved through combinations of clinical and pathological features. The biological mechanisms involved in tumor treatment response still need to be uncovered and associated with the current risk factors to further improve prediction of each child's risk of relapse. Retrospective studies from SIOP and COG pointed to alterations that are being explored prospectively in patients with WT. However, any potential prognostic markers require prospective validations that consider the underlying ITGH of each case.

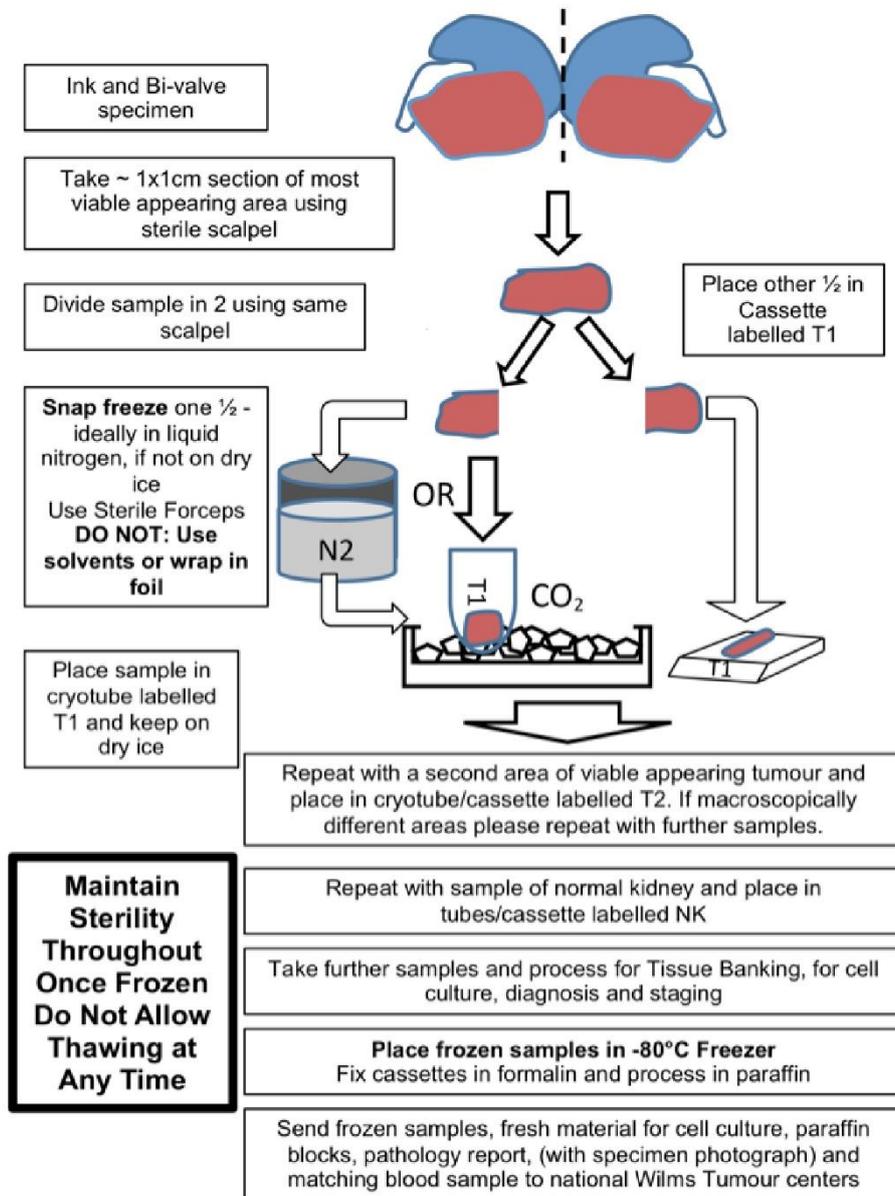
The current protocol recommends the collection of three tumor samples at different sites of the tumor and the adjacent normal kidney by the pathologist responsible for the diagnosis at the time of surgery. The area of the research sample must be removed from the region immediately adjacent to the diagnostic sample (paraffin block), avoiding areas of

necrosis and hemorrhage (Figure 1A). It is extremely important to correctly identify each tube and record patient data to enable later association of experimental findings with the clinical-pathological characteristics. The tubes should be labeled as tumor (TW1, TW2, TW3, and so on) and kidney (NK1, NK2) samples for proper handling at the biomarker research stage. Note that the normal counterpart for comparison with WT is the renal cortex and not the kidney medulla. Samples may be used for DNA, RNA, and/or protein satisfactorily.

Samples should be collected immediately after surgery, frozen in liquid nitrogen, and sent to the Biobank of the institution for correct storage (Figure 2). For institutions without a Biobank, it is possible to ask for a tube with an appropriate reagent for tissue storage that keeps the tissue viable for further experiments. If this is the case, recommendations are: 1. the sample should be completely submerged by the reagent; 2. one of the dimensions of the tissue should be smaller than 0.5 cm to enable rapid stabilization of the molecules; 3. the approximate ideal ratio is 1:10, equivalent to 10 mg of tissue to 100  $\mu$ L of reagent. Each tube contains between 800 and 1000  $\mu$ L of reagent. Samples will be safe if stored at 37 °C for 24 hours; 15-25 °C for one week; 4 °C for six months; -20 or -80 °C indefinitely. These tubes are provided only by the project coordinator and should be requested to the SIOP-BRTG via SOBOPE (Figure 1B). In one year, the BRTG received eighteen cases from six institutions with at least three tumor and



**FIGURE 1.** A. NEPHRECTOMY SPECIMEN. SAMPLES WERE COLLECTED FROM THREE TUMOR AREAS (1, 2, 3) AND ADJACENT NORMAL KIDNEY (NK) BY THE PATHOLOGIST. B - SCHEME FOR SAMPLE COLLECTION. TUBE TO KEEP THE FRESH TISSUE SAMPLE (800-1000 $\mu$ L OF REAGENT FOR 80 TO 100 MG OF TISSUE).



**FIGURE 2.** WORKFLOW FOR SUBMISSION OF TISSUE SAMPLES. SCHEME IS PART OF THE UMBRELLA SIOP-RTSG STUDY AND WAS KINDLY PROVIDED BY PROFESSOR KATHY PRITCHARD-JONES

one normal kidney samples from each case. All presented good quality for molecular analysis, pointing to the viability of this proposal.

These procedures are part of an attempt by the Brazilian Renal Tumors Group (BRTG) to promote research in renal tumors and to have active participation in molecular studies of international groups. Discussions regarding clinical, radiological, and pathological aspects of the patients are promptly discussed by email (tuwi\_comite@googlegroups.com). More information is available at [www.gbtr.com.br](http://www.gbtr.com.br) to increase participation in cooperative groups and improve diagnosis and treatment in such a heterogeneous country. All procedures were approved by the national ethical committee (CO-NEP 1.480.548; 2017).

Regarding WT pathology and molecular biology protocols, the BRTG complies with the UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 updated guidelines, carefully reviewed by a consensus of pathology experts within the group, who also proposed to stimulate international collaboration with the harmonization of treatment protocols and research, including the standardization of specimen handling and improved collection of biological samples<sup>35</sup>. These are of utmost impor-

tance to validate biomarkers such as MYCN amplification, 1q gain, and 17p loss. After all, the development and inclusion of true predictive biomarkers for pediatric patients with WT will only be possible by enabling large, international, high-quality databases and samples within cooperative studies.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to all the collaborators of the Brazilian Renal Tumor Group and to Maria Theresa de Sousa Accioly, Ph.D. and coordinator of the National Bank of tumors of INCA for supporting the storage of samples.

#### Author's contributions

All authors made substantial contributions to the development of the study, providing samples, drafting the manuscript with critical revision, and providing final approval of the version to be published.

#### RESUMO

Os tumores renais pediátricos correspondem a aproximadamente 7% de todos os tumores infantis, sendo o mais frequente o tumor de Wilms (TW). Crianças com TW são geralmente tratadas seguindo dois distintos protocolos terapêuticos (COG ou SIOP), sendo que no último, os pacientes recebem tratamento quimioterápico pré-operatório. Ambos apresentam sobrevida global em cinco anos em torno de 90%. TW é geneticamente heterogêneo, apresentando baixa prevalência de alterações somáticas conhecidas, com cerca de 30% dos casos apresentando mutações em genes conhecidos e um alto grau de heterogeneidade genética intratumoral (HGIT). Além de potencialmente ter um impacto sobre o desfecho clínico dos pacientes, a HGIT pode interferir na busca de marcadores moleculares que estão sendo testados prospectivamente pelos grupos COG e Siop. Nesta revisão, apresentamos a proposta do atual estudo Umbrella Siop 2017/Grupo de Tumores Renais Brasileiros (GTRB), que orienta a coleta de três diferentes regiões do tumor para melhor avaliar possíveis marcadores moleculares, bem como para compreender a biologia do TW.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tumor de Wilms. Biomarcadores. Heterogeneidade genética.

#### REFERENCES

1. Stillier CA, Parkin DM. International variations in the incidence of childhood renal tumours. *Br J Cancer*. 1990;62(6):1026-30.
2. Camargo B, Oliveira Ferreira JM, Souza Reis R, Ferman S, Oliveira Santos M, Pombo-de-Oliveira MS. Socioeconomic status and the incidence of non-central nervous system childhood embryonic tumours in Brazil. *BMC Cancer*. 2017;5:11160.
3. Dumoucel S, Gauthier-Villars M, Stoppa-Lyonnet D, Parisot P, Brisse H, Philippe-Chomette P, et al. Malformations, genetic abnormalities, and Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(1):140-4.
4. Brok J, Treger TD, Gooskens SL, van den Heuvel-Eibrink MM, Pritchard-Jones K. Biology and treatment of renal tumours in childhood. *Eur J Cancer*. 2016;68:179-95.
5. D'Angio GJ. The National Wilms Tumor Study: a 40 year perspective. *Lifetime Data Anal*. 2007;13(4):463-70.
6. SIOP Renal Tumour Study Group. Paediatric renal tumours: perspectives from the SIOP-RTSG. *Nat Rev Urol*. 2017;14(1):3-4.
7. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.
8. Gadd S, Huff V, Walz AL, Ooms AHAG, Armstrong AE, Gerhard DS, et al. A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nat Genet*. 2017;49(10):1487-94.
9. Mergelbier LH, Karlsson J, Lindgren D, Valind A, Liljebjörn H, Jansson C, et al. Intratumoral genome diversity parallels progression and predicts outcome in pediatric cancer. *Nat Commun*. 2015;6:6125.

10. Scott RH, Murray A, Baskcomb L, Turnbull C, Loveday C, Al-Saadi R, et al. Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget*. 2012;3(3):327-35.
11. Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47(6):461-70.
12. Torrezan GT, Ferreira FN, Nakahata AM, Barros BD, Castro MT, Correa BR, et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat Commun*. 2014;9:5:4039.
13. Walz AL, Ooms A, Gadd S, Gerhard DS, Smith MA, Guidry Auvil JM, et al. Recurrent DGC8, DROSHA, and SIX homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors. *Cancer Cell*. 2015;27(2):286-97.
14. Wegert J, Ishaque N, Vardapour R, Geörg C, Gu Z, Bieg M, et al. Mutations in the SIX1/2 pathway and the DROSHA/DGC8 miRNA microprocessor complex underlie high-risk blastemal type Wilms tumors. *Cancer Cell*. 2015;27(2):298-311.
15. Rakheja D, Chen KS, Liu Y, Shukla AA, Schmid V, Chang TC, et al. Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nat Commun*. 2014;2:4802.
16. Maschietto M, Williams RD, Chagtai T, Popov SD, Sebire NJ, Vujanic G, et al. TP53 mutational status is a potential marker for risk stratification in Wilms tumour with diffuse anaplasia. *PLoS One*. 2014;9(10):e109924.
17. Williams RD, Chagtai T, Alcaide-German M, Apps J, Wegert J, Popov S, et al. Multiple mechanisms of MYCN dysregulation in Wilms tumour. *Oncotarget*. 2015;6(9):7232-43.
18. Segers H, van den Heuvel-Eibrink MM, Williams RD, van Tinteren H, Vujanic G, Pieters R, et al. Gain of 1q is a marker of poor prognosis in Wilms' tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(11):1065-74.
19. Chagtai T, Zill C, Dainese L, Wegert J, Savola S, Popov S, et al. Gain of 1q as a prognostic biomarker in Wilms tumors (WTs) treated with preoperative chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 Trial: a SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study. *J Clin Oncol*. 2016;34(26):3195-203.
20. Gracias EJ, Dome JS, Jennings LJ, Chi YY, Tian J, Anderson J, et al. Association of chromosome 1q gain with inferior survival in favorable-histology Wilms tumor: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2016;34(26):3189-94.
21. Grundy PE, Breslow NE, Li S, Perlman E, Beckwith JB, Ritchey ML, et al; National Wilms Tumor Study Group. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol*. 2005;23(29):7312-21.
22. Spreafico F, Gamba B, Mariani L, Collini P, D'Angelo P, Pession A, et al. AIFOP Wilms Tumor Working Group. Loss of heterozygosity analysis at different chromosome regions in Wilms tumor confirms 1p allelic loss as a marker of worse prognosis: a study from the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology. *J Urol*. 2013;189(1):260-6.
23. Dix DB, Fernandez CV, Chi Y-Y, Anderson JR, Mullen EA, Geller JI, et al. Augmentation of therapy for favorable histology Wilms tumor combined with loss of heterozygosity of chromosomes 1p and 16q: a report from the Children's Oncology Group studies AREN0532 and AREN0533. *J Clin Oncol*. 2015;33:15.
24. Beckwith JB, Zuppan CE, Browning NG, Moksness J, Breslow NE. Histological analysis of aggressiveness and responsiveness in Wilms' tumor. *Med Pediatr Oncol*. 1996;27(5):422-8.
25. Maschietto M, Camargo B, Brentani H, Grundy P, Sredni ST, Torres C, et al. Molecular profiling of isolated histological components of Wilms tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway in kidney and tumor development. *Oncology*. 2008;75(1-2):81-91.
26. Charlton J, Williams RD, Sebire NJ, Popov S, Vujanic G, Chagtai T, et al. Comparative methylome analysis identifies new tumour subtypes and biomarkers for transformation of nephrogenic rests into Wilms tumour. *Genome Med*. 2015;7(1):1.
27. Fukuzawa R, Anaka MR, Morison IM, Reeve AE. The developmental programme for genesis of the entire kidney is recapitulated in Wilms tumour. *PLoS One*. 2017;12(10):e0186333.
28. Young MD, Mitchell TJ, Vieira Braga FA, Tran MGB, Stewart BJ, Ferdinand JR, et al. Single-cell transcriptomes from human kidneys reveal the cellular identity of renal tumors. *Science*. 2018;361(6402):594-9.
29. Perlman EJ. Pediatric renal tumors: practical updates for the pathologist. *Pediatr Dev Pathol*. 2005;8(3):320-38.
30. Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumor/genesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):699-712.
31. Cresswell GD, Apps JR, Chagtai T, Mifsud B, Bentley CC, Maschietto M, et al. Intra-tumor genetic heterogeneity in Wilms tumor: clonal evolution and clinical implications. *EBioMedicine*. 2016;9:120-9.
32. Wegert J, Wittmann S, Leuschner I, Geissinger E, Graf N, Gessler M. WT1 inactivation is a frequent, but late event in Wilms tumors without apparent clinical impact. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(12):1102-11.
33. Spreafico F, Ciceri S, Gamba B, Torri F, Terenziani M, Collini P, et al. Chromosomal anomalies at 1q, 3, 16q, and mutations of SIX1 and DROSHA genes underlie Wilms tumor recurrences. *Oncotarget*. 2016;7(8):8908-15.
34. Wegert J, Vokuhl C, Ziegler B, Ernestus K, Leuschner I, Furtwängler R, et al. TP53 alterations in Wilms tumour represent progression events with strong intratumour heterogeneity that are closely linked but not limited to anaplasia. *J Pathol Clin Res*. 2017;3(4):234-48.
35. Vujanic GM, Gessler M, Ooms AHAG, Collini P, Coulomb-L'Hermine A, D'Hooghe E, et al; International Society of Paediatric Oncology-Renal Tumour Study Group (SIOP-RTSG). The UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 Wilms tumour pathology and molecular biology protocol. *Nat Rev Urol*. 2016;15(11):693-701.





Article

## Genes Controlled by DNA Methylation Are Involved in Wilms Tumor Progression

João Victor da Silva Guerra<sup>1,2,†</sup>, Bruna Maria de Sá Pereira<sup>3,†</sup>, Jéssica Gonçalves Vieira da Cruz<sup>4</sup>, Nicole de Miranda Scherer<sup>4</sup>, Carolina Furtado<sup>3</sup>, Rafaela Montalvão de Azevedo<sup>3</sup>, Paulo Sergio Lopes de Oliveira<sup>1</sup>, Paulo Faria<sup>3</sup>, Mariana Boroni<sup>4</sup>, Beatriz de Camargo<sup>3</sup> and Mariana Maschietto<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPq), Campinas 13083-970, Brazil

<sup>2</sup> Graduate Program in Biosciences and Technology of Bioactive Products, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil

<sup>3</sup> Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro 20231-050, Brazil

<sup>4</sup> Bioinformatics and Computational Biology Lab, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro 20231-050, Brazil

<sup>5</sup> Boldrini Children's Hospital, Campinas 13083-884, Brazil

\* Correspondence: marianamasc@gmail.com; Tel.: +55-19-3787-9087

† These authors contributed equally to this work.

Received: 11 July 2019; Accepted: 15 August 2019; Published: 17 August 2019



**Abstract:** To identify underlying mechanisms involved with metastasis formation in Wilms tumors (WTs), we performed comprehensive DNA methylation and gene expression analyses of matched normal kidney (NK), WT blastemal component, and metastatic tissues (MT) from patients treated under SIOP 2001 protocol. A linear Bayesian framework model identified 497 differentially methylated positions (DMPs) between groups that discriminated NK from WT, but MT samples were divided in two groups. Accordingly, methylation variance grouped NK and three MT samples tightly together and all WT with four MT samples that showed high variability. WT were hypomethylated compared to NK, and MT had a hypermethylated pattern compared to both groups. The methylation patterns were in agreement with methylases and demethylases expression. Methylation data pointed to the existence of two groups of metastases. While hierarchical clustering analysis based on the expression of all 2569 differentially expressed genes (DEGs) discriminated WT and MT from all NK samples, the hierarchical clustering based on the expression of 44 genes with a differentially methylated region (DMR) located in their promoter region revealed two groups: one containing all NKs and three MTs and one containing all WT and four MTs. Methylation changes might be controlling expression of genes associated with WT progression. The 44 genes are candidates to be further explored as a signature for metastasis formation in WT.

**Keywords:** Wilms tumor; cancer progression; DNA methylation; gene expression; data integration; DNMT; TET

### 1. Introduction

Wilms tumor (WT) is an embryonic renal tumor with a median age adjusted incidence rate of 8.33 per million in Brazil [1]. The most frequently mutated genes in WT are *WT1* (12%), *AMER1* (18%), *CTNBN1* (15%), and *DROSHA* (12%) [2–6]. Genome-wide analysis in a large collection of tumors identified additional somatically mutated genes found less frequently, with most mutations often occurring in the same tumors. Currently, there are 37 genes found recurrently mutated in WT [7], which individually are not enough to cause tumor development in more than 5% of the patients. Although

constitutional for 3% of the patients that do not present obvious clinical symptoms [8], around 70% of WT present imprinting abnormalities at the imprinting control region (ICR) of *IGF2/H19* [3] pointing to alterations in the mechanisms of gene expression regulation as being involved in WT formation [9]. WTs have lower LINE-1 methylation levels than paired adjacent normal kidney tissues, with tumors from patients that relapsed presenting even lower levels than those that did not relapse [10]. Methylation levels from CpG sites located close to genes or in intergenic regions divided WT in two subgroups, one with a methylation profile similar to nephrogenic rests and a second group presenting increased high methylation variability, hypomethylation of renal developmental genes, and hypermethylation of cell adhesion genes [11], this subgrouping still needs further confirmation.

Patients with WT are treated by either Children Oncology Group (COG) or International Society of Pediatric Oncology (SIOP) protocols, and had an overall survival rate of 90%, which strongly relies on the histological subtype and tumor stage [12]. The later include preoperative chemotherapy, followed by surgery and adjusted chemotherapy (radiotherapy for selected cases), according to tumor initial response [13,14]. The diverse WT histology stratifies patients in low (completely necrotic), intermediate (stromal, epithelial, mixed, and regressive tumors), and high (blastemal and diffuse anaplastic tumors) risks. While patients with low and intermediate risk tumors present 88% 5-year event free survival, patients with blastemal predominant tumors show 58% 5-year event free survival [15]. Diffuse anaplastic tumors have *TP53* abnormalities in 60% of the cases, present as an heterogeneous marker [16–18], which was associated with increased risk of recurrence and death [16]. There are several efforts in the search for biomarkers to improve the current risk stratification system [19–21]. Patients with WT might still be over- or under-treated and to predict those that will relapse remains difficult [22]. Avoiding the adverse treatment effects remains a challenge, especially considering the heterogeneous genetic susceptibility to other tumors, renal and heart diseases, among others [23–25].

Although DNA methylation and gene expression disruption were implicated in Wilms tumorigenesis, these mechanisms have not been explored in metastasis formation. Here, we explore DNA methylation together with gene expression in matched trios of normal kidney (NK), WT, and metastatic tissue (MT) to gain insight into the biology underlying WT progression.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample Collection and DNA and RNA Extraction

Patients were enrolled in the Brazilian National Institute of Cancer (INCA) into the International Society of Pediatric Oncology (SIOP) clinical trial 2001. All 110 cases (2003–2014) registered to the Department of Pathology were reviewed by a pathologist and a clinician that selected 11 cases (33 paired samples) that presented viable tissues in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks of matched normal kidney (cortex), WT (blastemal component), and metastatic tissues (all from lung). A total of 27 samples from nine cases passed quality control parameters for DNA and/or RNA integrity, five cases were evaluated by both methodologies, two cases were evaluated only for methylation experiments, and two cases only for expression experiments (Table 1). Microdissection was carried out by two punches of 1-mm core samples to maximize cellular homogeneity (>80% of blastemal cells). DNA and RNA from FFPE were extracted using QIAamp DNA Mini kit (Qiagen®, Hilden, Germany) and RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), respectively, following manufacture procedures.

The Research Ethics Committee from INCA independently approved the study (ID 170/13), and informed consent was obtained from the patients' legal guardians. All experiments were performed in compliance with the Helsinki guidelines.

**Table 1.** Clinicopathological characteristics of the cases evaluated for DNA methylation and gene expression.

Sample (ID)	Age at Diagnosis (years)	Gender	Histology (Primary Tumor)	Patient Stage	Relapse Site	Histology (Metastasis)	Technique
1	3	F	Blastemal	III	Left lung	Mixed	RNA-Seq/450k
2	7	M	Regressive	II	Left lung	Epithelial	RNA-Seq/450k
3	5	M	Mixed	I	Left lung	Blastemal	RNA-Seq/450k
4	3	F	Mixed	II	Right lung	Blastemal	RNA-Seq
5	3	F	Mixed	II	Right and left lung	Epithelial	450k
6	9	M	Mixed	I	Left lung	Mixed	450k
7	4	M	Regressive	I	Right lung	Blastemal	RNA-Seq
9	3	M	Mixed	I	Right lung	Blastemal	RNA-Seq/450k
10	6	M	Mixed	I	Right lung	Mixed	RNA-Seq/450k

Gender: female (F) and male (M).

## 2.2. Infinium HumanMethylation450 BeadChip Arrays (Illumina) Procedures

FFPE extracted DNA was recovered using Infinium HD FFPE Restore Protocol kit (Illumina, Inc, San Diego, CA, USA) and treated with EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research Corp, Corporation, Irvine, CA, USA), following manufacturer's guidelines. Thirty samples were profiled in the HumanMethylation450 BeadChip arrays (HM450K, Illumina), following the Illumina Infinium HD methylation protocol by Deoxi Biotecnologia ([www.deoxi.com](http://www.deoxi.com)). Scanned HM450K (iScan SQ Scanner, Illumina) were processed into IDAT files by GenomeStudio software (v.2011.1, Illumina Inc, San Diego, CA, USA, 2011), with methylation module v.1.9.0 (Illumina). Probes were annotated according to the Illumina annotation file using the Human GRCh37/hg19.

Quality control assessment pointed to two samples with low coverage and poor density profiles (Figure S1), resulting in the exclusion of two incomplete matched trios, leaving 21 matched samples (seven trios) for methylation experiments. Further steps implemented in minfi package [26] removed probes presenting unreliable fluorescence measurements, including multi-hit probes [27] ( $n = 6830$ ), located in XYS ( $n = 52,017$ ) and failed probes ( $\text{detP} > 0.05$ ,  $n = 73,045$ ). To best fit Infinium II to I probes, we applied Quantile [28] normalization on the remaining 353,620 probes (Figure S2). Methylation levels for each probe were shown as beta-values (0: unmethylated, 1: methylated), used for graphical representations; M-values (beta-values logit transformation) were used for statistical analysis due to the homoscedastic behavior, unless otherwise stated.

## 2.3. Methylation Statistical Analysis

To compare groups avoiding cellular heterogeneity effects, the sva package [29] was applied to estimate surrogate variables. Limma package [30] was used to generate an empirical Bayesian framework linear model [31] on matched trios, considering intra-patient and interpatient comparison. The estimated surrogate variables were considered covariables before identification of differentially methylated positions (DMPs). In the matched trio comparison, we considered significant those CpG sites with adjusted  $p$ -values  $< 0.001$ . In the pairwise comparisons, we considered significant those positions with an absolute mean beta change higher than 10% and  $p$ -value  $< 0.01$ .

DMRcate was applied to identify differentially methylated regions (DMRs), defined as a 300 nucleotides sequence with at least seven CpG sites presenting methylation changes in the same direction [32]. Genomic regions with  $p$ -value  $< 0.05$  and mean methylation differences greater than 10% ( $\text{delta-beta} > 0.1$ , hypermethylation) and smaller than 10% ( $\text{delta-beta} < -0.1$ , hypomethylation) were considered the top ones. DMRs were annotated for overlapping promoter regions, considering  $\pm 2000$  base pairs from transcription starting site of each gene. Functional annotation was performed by enrichment analysis using GREAT on the DMRs' genomic regions [33].

#### 2.4. RNA Library Construction and Sequencing

RNA samples were quantified by spectrophotometry using Nanodrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), followed by a quality control step by quantitative RT-PCR for *GAPDH* (114 nt). Sequencing libraries were generated with the TruSeq<sup>®</sup>RNA Access Library Prep (Illumina), appropriated for RNA extracted from FFPE tissues according to manufacturer's procedures. We checked for sample quality at every step of analysis, discarding samples that did not reach the parameters. From 33 samples, 12 samples were excluded due to low quality, leaving 21 samples (7 matched trios) for RNA sequencing. For clustering, 2 nM libraries were denatured with 0.1M NaOH and diluted at 12 pM HT1 buffer (Illumina) and loaded in cBot. Libraries were sequenced in the HiSeq2500 (Illumina) and the quality of the fastq files was evaluated by FastQC v.0.11.5 (Babraham Institute, Babraham, Cambridge, UK) [34]. Low quality bases, (phred score < 33, minimum length = 36 pb), and adapter sequences were removed using Trimmomatic v0.36 (RWTH Aachen University, Aachen, Germany) [35], while poly-A tails were removed using Prinseq-lite v0.20.4 (University of Birmingham, Birmingham, UK) [36] followed by data quality re-evaluation by FastQC. Both paired and unpaired reads were processed to recover maximum reads sequenced. Unpaired reads refer to those that one of the sequenced reads were not used due to low quality according to the evaluated metrics, but we considered them as technical replicates. Then, reads were mapped to the GRCh38 reference genome (*Homo sapiens*, Ensembl) using STAR v2.5.3a [37], after removing the pseudogenes from the reference genome annotation file, generating the alignment statistics (Tables S1 and S2). SAM files (Sequence Alignment/Mapping) were converted to BAM (Binary SAM) files using SAMtools [38] and visualized in the Integrative Genome Browser (IGV) 2.4.4 [39].

#### 2.5. Gene Expression Analysis

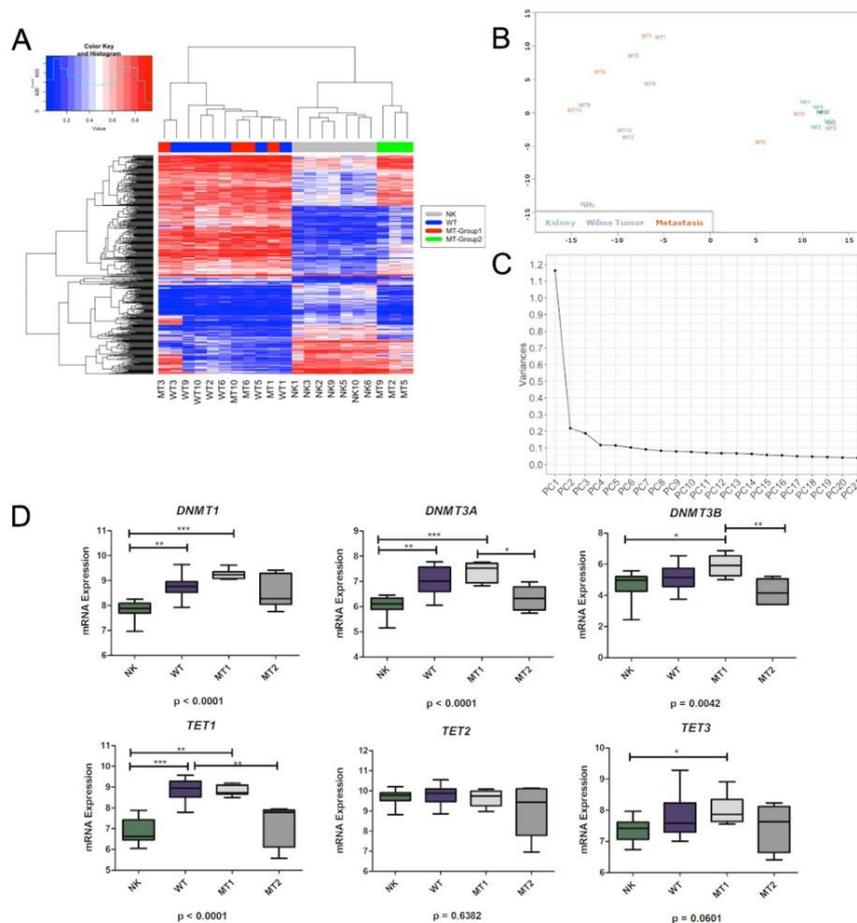
We used the HTSeq v0.6.1 (University of Heidelberg, Heidelberg, Germany) [40] to identify the number of reads mapping to each gene. Data were normalized with DESeq2 package (University of North Carolina, Chapel Hill, ND, USA) [41], which accounts for sequencing depth and generates an expression matrix containing all genes for the 21 matched samples. We considered as differentially expressed genes (DEG), those genes that presented False Discovery Rate (FDR) < 0.001 and lfcThreshold = 0.1.

### 3. Results

#### 3.1. DNA Variability Suggests the Existence of Two Groups of Metastatic Tissues

DNA methylation for 353,620 CpG sites was evaluated in seven patients of matched NK, WT, and MT tissues. Comparison between matched trios (NK, WT, and MT) allowed the identification of 497 differentially methylated positions (DMPs; adjusted *p*-value < 0.001), with 345 DMPs located in 301 genes. Regarding to CpG island, 342 DMPs (69%) were located in CpG island, shores, or shelves whereas 155 DMPs (31%) were located in open sea (*p*-value < 0.0001; chi-squared test). Hierarchical clustering based on these DMPs (Euclidean distance with average linkage) resulted in two clusters: one containing all WT and four metastatic samples and a second containing all NK and three metastatic samples (Figure 1A). Likewise, methylation CpG levels show that NK, WT, and MT are distinct tissues and that there are two groups of metastases (MT-Group1: MT1, MT3, MT6, MT10, and MT-Group2: MT2, MT5, MT9). The level of similarity between samples using multidimensional scaling (MDS) applied to the 1% most variable sites (Figure 1B) showed that NK and three MT samples grouped tightly together (MT-Group2) and all WT and four MT samples (MT-Group1) showed high variability (*p*-value < 10<sup>-16</sup>; Levene's test). Consistently, we observed less variance at single CpG sites among NK (67.5%, *n* = 2386, s.d. < 0.1) than in WT (8.0%, *n* = 282, s.d. < 0.1) and within the metastatic samples, MT-Group2 (47.8%, *n* = 1692, s.d. < 0.1) showed less variance than MT-Group1 (22.7%, *n* = 804, s.d. < 0.1). To gain a comprehensive insight into the variation in DNA methylation between the three groups, we applied Principal Component Analysis (PCA) to the full dataset. The principal component (PC) 1 and 2 explained 88.1% and 3.1% of the variance (Figure 1C), respectively, which

clearly separated NK and WT and both groups of metastases. This suggests that NK has a more stable epigenome than WT, consistent with previous reports in normal and cancer tissues. MT-Group1 had twice as many variant CpGs than MT-Group2, pointing to differences in the genomic stability between both groups. The histology of the metastatic samples as well as the clinicopathological characteristics of the tumors are presented in Table 1.



**Figure 1.** Methylation analyses in matched trios of normal kidney (NK), Wilms tumor (WT), and metastatic tissues (MT). **(A)** Hierarchical clustering (Euclidean distance with average linkage) of the 21 samples, based on methylation levels of the 497 differentially methylated CpG sites. Heatmap colors refer to methylation levels: unmethylated (blue), partially methylated (white), and methylated (red). **(B)** Multidimensional scaling of the top 1% most variable positions. **(C)** Variance in DNA methylation related to each principal component identified. **(D)** Boxplot representing expression levels (from RNAseq) for *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET1*, *TET2*, and *TET3*. Kruskal–Wallis test followed by Dunn post-test was applied: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . NK: normal kidney ( $n = 7$ ), WT: Wilms tumor ( $n = 7$ ), MT1: metastasis group 1 ( $n = 4$ ), MT2: metastasis group 2 ( $n = 3$ ).

### 3.2. Methylation Differences May Be Related to DNMTs and TETs Expression

By applying pairwise comparisons between NK, WT, and MT groups, we identified 8860 hypo- and 8746 hypermethylated positions between WT and NK and 825 hypo- and 1314 hypermethylated DMPs between MT and WT ( $p$ -value  $< 0.01$  and Delta beta-value (DB)  $> 10\%$ ). Most of the DMPs from WT and NK were located in CpGs island, shores, or shelves, independently of its methylation pattern (61% hypomethylated and 65% in hypermethylated DMPs), similar to the DMPs from MT and WT (59% hypomethylated and 66% in hypermethylated DMPs).

Further, we verified the expression of methylases and demethylases by looking for a correlation between methylation pattern observed in NK, WT, and MT, considering both MT-groups. *DNMT1*, *DNMT3A*, and *TET1* reported lower expression in NK compared to WT. MT-Group1 and MT-Group2 showed different expression levels for *DNMT3A* and *DNMT3B*, again with MT-Group1 showing expression levels similar to WT and MT-Group2 being more similar to NK (Figure 1D).

### 3.3. Genes Controlled by DNA Methylation Confirm the Existence of Two Groups of Metastases

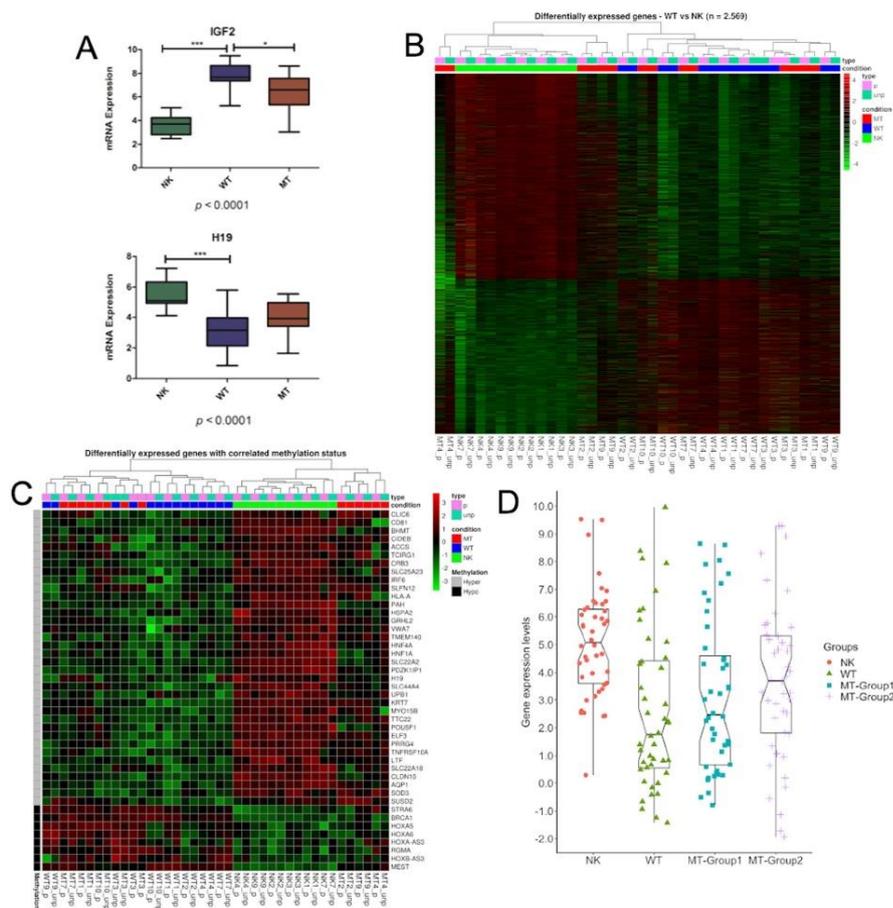
To examine the relationship between methylation and RNA expression, we correlated the methylation levels of DMRs and the expression of the closest genes. By comparing WT and NK, we identified 92 hypo- and 207 hypermethylated regions in WT ( $p$ -value  $< 0.05$  and DB  $> 10\%$ ), and 1.100 up and 1.469 downregulated genes (FDR  $< 0.001$ ) in WT compared to NK, with 44 showing agreement between hypomethylation/over-expression ( $n = 8$ ) and hypermethylation/down-expression ( $n = 36$ ) (Table 2). Similar to previous studies [3,7], methylation of 11p15 ICR1 correlated with IGF2 and H19 expression (Figure 2A). Four genes from HOX family reported hypomethylation associated with over-expression: *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA-AS3*, and *HOXB-AS3*. Five genes are recognized tumor suppressor genes, the hypermethylation was associated to down-regulation for *LTF*, *SUSD2*, *HNF4A*, *TNFRSF10A*, and *H19*. The exception was *BRCA1* that presented promoter hypomethylation but was over-expressed in WT. These findings suggest that DNA methylation could be a mechanism for loss of function in a subset of tumors. While hierarchical clustering analysis based on the expression of all 2569 differentially expressed genes (DEGs) discriminated WT and MT from all NK samples (Figure 2B), the hierarchical clustering based on the expression of 44 genes revealed two groups: one containing all NKs and three MTs and a second containing all WT and two MTs (Figure 2C).

Table 2. List of 44 genes showing negative correlation between promoter methylation and gene expression levels.

Gene	DMR Location	Number of CpGs	DMR Width (Bp)	Minimum p-value	Methylation Status (MaxBetaFC)	Methylation Status (MeanBetaFC)	Expression (Log2FC)
ACCS	chr11:44087396-44088257	12	862	5 × 10 <sup>-19</sup>	0.5	0.3	-1.4
AQP1	chr7:30951064-30951801	11	738	6 × 10 <sup>-18</sup>	0.4	0.1	-3.9
RHMT	chr5:78407153-78407683	8	531	4 × 10 <sup>-40</sup>	0.5	0.4	-7.5
BRC A1	chr17:41277974-41279022	21	1049	2 × 10 <sup>-25</sup>	-0.5	-0.2	2.2
CD81	chr11:2397255-2398336	21	1082	2 × 10 <sup>-46</sup>	0.4	0.2	-1.2
CIDEB	chr14:24779793-24780926	13	1134	4 × 10 <sup>-43</sup>	0.6	0.2	-2.2
CLDN10	chr13:96204518-96204978	8	461	1 × 10 <sup>-4</sup>	0.2	0.1	-5.6
CLIC6	chr21:36041334-36041699	8	366	1 × 10 <sup>-52</sup>	0.6	0.5	-3.0
CRB3	chr19:6463949-6464275	9	327	1 × 10 <sup>-23</sup>	0.4	0.3	-5.3
ELF3	chr1:201979478-201979938	7	461	1 × 10 <sup>-6</sup>	0.3	0.1	-4.8
GRHL2	chr8:102504447-102504859	8	413	7 × 10 <sup>-16</sup>	0.3	0.2	-4.0
H19	chr11:2019452-2020560	29	1109	4 × 10 <sup>-12</sup>	0.3	0.1	-2.1
HLA-A	chr6:29910411-29911095	8	685	4 × 10 <sup>-18</sup>	0.4	0.2	-2.2
HNF1A	chr12:121416315-121416796	7	482	7 × 10 <sup>-10</sup>	0.4	0.2	-4.9
HNF4A	chr20:42983920-42984878	12	959	1 × 10 <sup>-17</sup>	0.4	0.2	-5.4
HOXA-AS3	chr7:27183816-27185512	26	1697	5 × 10 <sup>-16</sup>	-0.3	-0.2	2.6
HOXA5	chr7:27183816-27185512	26	1697	5 × 10 <sup>-16</sup>	-0.3	-0.2	1.8
HOXA6	chr7:27183816-27185512	26	1697	5 × 10 <sup>-16</sup>	-0.3	-0.2	2.3
HOXB-AS3	chr17:46669455-46670029	9	575	4 × 10 <sup>-16</sup>	-0.3	-0.1	2.7
HSPA2	chr14:65006688-65007437	16	750	1 × 10 <sup>-15</sup>	0.4	0.2	-3.9
IRF6	chr1:209979111-209979779	9	669	3 × 10 <sup>-22</sup>	0.5	0.3	-2.8
KRT7	chr12:52626814-52627576	8	763	1 × 10 <sup>-8</sup>	0.4	0.2	-5.8
LTF	chr3:46506104-46506354	9	451	3 × 10 <sup>-5</sup>	0.3	0.2	-7.0
MEST	chr7:130130753-130131730	13	978	3 × 10 <sup>-9</sup>	-0.2	-0.1	3.7
MYO15B	chr17:73383839-73384360	9	522	1 × 10 <sup>-7</sup>	0.3	0.2	-1.6
PAH	chr12:103310839-103311761	9	923	8 × 10 <sup>-20</sup>	0.3	0.2	-8.1
PDK1IP1	chr1:4765599-47656423	7	825	7 × 10 <sup>-7</sup>	0.3	0.2	-7.3
POU5F1	chr6:31148404-31148748	7	345	1 × 10 <sup>-6</sup>	0.2	0.1	-4.7
PRRG4	chr11:32851087-32851531	9	445	1 × 10 <sup>-4</sup>	0.2	0.1	-4.2
RGMA	chr15:93616894-93617168	11	275	2 × 10 <sup>-9</sup>	-0.3	-0.2	2.7
SLC22A18	chr11:2925394-2925969	8	376	2 × 10 <sup>-4</sup>	0.2	0.1	-2.5
SLC22A2	chr6:160679391-160680162	10	772	3 × 10 <sup>-13</sup>	0.3	0.2	-8.0
SLC25A23	chr19:6463949-6464275	9	327	1 × 10 <sup>-23</sup>	0.4	0.3	-1.6

Table 2. Cont.

Gene	DMR Location	Number of CpGs	DMR Width (Bp)	Minimum p-value	Methylation Status (MaxBetaFC)	Methylation Status (MeanBetaFC)	Expression (Log2FC)
SLC44A4	chr6:31846769-31847028	8	260	1 × 10 <sup>-7</sup>	0.2	0.2	-4.1
SLFN12	chr17:33759512-33760527	11	1016	1 × 10 <sup>-14</sup>	0.5	0.3	-1.7
SOD3	chr4:24796689-24797176	7	488	1 × 10 <sup>-3</sup>	0.2	0.1	-2.3
STRA6	chr15:74494781-74495354	7	574	4 × 10 <sup>-15</sup>	-0.3	-0.2	3.6
SUSD2	chr22:24577223-24577448	7	226	4 × 10 <sup>-3</sup>	0.3	0.1	-2.7
TICRG1	chr11:67806118-67806668	7	551	3 × 10 <sup>-30</sup>	0.6	0.4	-2.2
TMEM140	chr7:134832544-134833299	7	756	9 × 10 <sup>-10</sup>	0.4	0.2	-3.1
TNFRSF10A	chr8:23082634-23082961	7	328	2 × 10 <sup>-4</sup>	0.3	0.2	-3.1
TTC22	chr1:55266296-55267152	8	857	1 × 10 <sup>-7</sup>	0.3	0.2	-5.7
UPB1	chr22:24891141-24891666	8	526	2 × 10 <sup>-10</sup>	0.3	0.2	-3.1
VWA7	chr6:31740805-31741184	8	380	1 × 10 <sup>-9</sup>	0.2	0.2	-1.7



**Figure 2.** Genes controlled by DNA methylation. (A) Boxplot of expression levels across the groups (NK, WT, and MT) for *IGF2* and *H19* (ANOVA and Tukey’s Multiple Comparison Test; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ) (B) Hierarchical clustering (distance was measured as 1-Pearson correlation coefficient with complete linkage) of the paired seven cases (21 samples), based on expression levels of the (B) 2569 differentially expressed genes (DEGs) and (C) 44 genes controlled by methylation. Heatmap colors refer to expression levels Z-score transformed: lower expression (green), median levels partially methylated (black), and highly expressed (red). (D) Boxplot of expression levels across the groups (NK, WT, MT-Group1, and MT-Group2) for 44 genes controlled by methylation. NK: normal kidney ( $n = 7$ ), WT: Wilms tumor ( $n = 7$ ), MT: metastasis ( $n = 7$ ), MT-Group1: metastasis group 1 ( $n = 4$ ), MT-Group2: metastasis group 2 ( $n = 3$ ).

Thus, we verified the expression of these 44 genes in the MT samples (Figure 2D; Figure S3). Overall, the 44 genes expression showed a higher variance in MT-Group1, similar to WT, and a smaller variance in MT-Group2, closer to NK, suggesting their involvement into different paths of tumor progression.

### 3.4. Characterization of the DMRs within the Metastatic Groups

To investigate how the two MT groups differentiate, we then established which methylated regions primarily discriminated between both MT groups and their matched WT. We identified 13 hypo- and 21 hypermethylated regions between MT-Group1 and WT, located in 11 (13 genes) and 19 (26 genes) promoters. These DMRs were enriched for five molecular functions: antigen binding, *TAP1* and *TAP2* binding, peptide antigen binding and peptide-transporting ATPase activity (FDR < 0.01; Table S3) and no biological processes. DMRs with the higher methylation differences (>20%) were located at the promoter regions of *RUSC1* (and *RUSC1-AS1*), *KCNQ1DN*, both more methylated in MT-Group1, *DNHD1* and *EXOC3L2*, both more methylated in WT.

The comparison between MT-Group2 and WT reported 130 hypo- and 36 hypermethylated regions, located in 118 (155 genes) and 30 (38 genes) promoters. These DMRs were enriched for two molecular functions: peptide antigen binding and MHC class II receptor activity (Table S4); and for several biological processes including antigen processing and presentation of exogenous antigen, genetic imprinting, interferon-gamma-mediated signaling pathway, meiosis, and regulation of T cell mediated cytotoxicity (FDR < 0.01, Table S5). All the DMRs with the higher methylation differences (>40%) were more methylated in WT than in MT-Group2, with one not located in gene promoter and 10 located the promoter of *HIST1H4I*, *HCG9*, *SALL4*, *CACNATC-AS1*, *GRIK2*, *SIM2*, *ELTD1*, *ZNF300P1*, *NKAPL*, *ZKSCAN4*, and *RP11-573G6*.

To verify again the similarities between MT-Group2 and NK, we compared the expression levels between both MT groups identifying 2880 and 598 DEGs between MT-Group1 and MT-Group2, respectively, versus NK. This analysis showed that MT-Group1 has 5.8 more DEGs with 425 (71%) common genes between both comparisons.

## 4. Discussion

We investigated global gene expression and DNA methylation in case-matched triplets (normal tissue, primary cancer, and lung metastasis) to apply a comprehensive analysis of WT disease progression. Both variance and differential methylation analyses pointed to the existence of two groups of metastases. The methyltransferases *DNMT3A* and *DNMT3B* also reported differential expression between both groups. Similar to findings in other cancers [42], tumor samples presented high variance whereas normal samples clustered together, with the metastatic tissues showing low or high variance, similar to normal or tumor tissues. These groups were not identified in the expression data when all DEGs were considered. Nevertheless, using only DEGs that had a DMR located in the respective promoter, the clustering analysis identified the two groups of metastatic samples. We selected areas containing blastema (>80% of the cells); however, we cannot exclude the possibility of contamination by other cell types, resulting in, at least partially, differences in DNA methylation and gene expression.

MT-Group1 and MT-Group2 exhibited distinct methylation and expression patterns with MT-Group2 being more similar to NK suggesting that alterations in DNA methylation rather than acquisition of mutations are involved with metastasis. This difference was also observed at expression levels that showed that MT-Group1 had almost six more differentially expressed genes than MT-Group2, compared to NK. Epigenetic patterns were described within tumor types and associated to distinct clinical and pathological characteristics, such as age to diagnosis, sex, and relapse [42,43], what could related to the existence of both metastatic groups, however, a larger cohort is necessary to characterize the subgroups. Another hypothesis is that MT-Group1, that preserves WT alterations is not yet completely adapted to the new microenvironment while samples from MT-Group2 are already established in the lung presenting methylation and expression levels related to the survival in a fully differentiated and functional organ.

Changes during tumor progression were analyzed using DMRs from matched primary and normal tissues, which were then individually evaluated in metastatic samples. We found that a minority (14.7%, 44 out of 299) of the DMRs showed negative correlation between methylation and expression levels. This relatively low correspondence may be explained by the fact that we only used DMRs

located in gene promoters. A downstream (up to 8 kilobases (kb)) or upstream (−2 kb to 0.3 kb) region away from the promoter seems to have a stronger correlation [44]. Nevertheless, we found two out of three DMRs previously found hypermethylated in WT compared to NK: chr6:28956259-28956804 and chr6:32115979-32117565 located in *HCG16* and *PRRT1*, respectively [45]. Control of *H19* and *IGF2* expression by methylation and their association with WT is well described [3,46–48], thus validating our other findings. Most of the 44 genes were not previously described in WT but they have been associated to tumor progression and resistance to chemotherapy treatment in other cancers. Therefore, they might be of clinical interest for stratification of patients into high and low metastatic risk as well as to disclose potential targets for development of new therapies.

It is likely that epigenetic regulation of gene expression plays an important role in regulating the expression of transcription factors that determine progenitor self-renewal and/or nephron differentiation. PRC2 is recruited to unmethylated CpG sites to place the H3K27me3 mark at promoter and enhancer regions, resulting in transcriptional repression and nucleosome compaction. Repression of PRC2 (and PRC1) is believed to be a major mechanism whereby gene expression is negatively regulated during development, including HOX and SOX genes [49]. The HOX family are well-known genes with roles in development, differentiation, and motility, with their aberrant expression related to epigenetic alterations in tumorigenesis. In normal differentiated tissues, HOX genes are usually methylated, which is lost in tumors, together with the increase in expression, as demonstrated in myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia [50]. In our study, *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA-AS3*—all in the same cluster—and *HOXB-AS3* showed negative correlation between expression and methylation.

Some tumor suppressor genes may have lost their function in WT by disruption of DNA methylation in their promoter regions. *HNF4A* was involved with regulation of embryonic development of multiple tissues, including renal development [51]. Little is known about the epigenetic mechanism of this gene regulation, but in young-adult mouse liver *HNF4A* deficiency alters histone methylation and acetylation [52]. In humans, changes in *HNF4A* expression were associated with liver, colon, and hepatocellular carcinoma tumorigenesis [53]. *TNFRSF10A* is a receptor activated by tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand *TNFSF10*, signaling for cell apoptosis. Its suppression is associated with inactivation of apoptotic pathways and consequently to tumor development in osteosarcomas [54], gastric carcinomas [55], and glioblastoma multiforme [56,57]. *SUSD2* is type I membrane protein containing domains inherent to adhesion molecules, in which downregulation was associated with proliferative capacity renal cell and lung carcinomas [58] and other cancers [59,60]. *SUSD2* interacts with *GAL1* to promote tumor immune evasion, angiogenesis, and metastasis [59]. *LTF* also has an immune regulatory function. The association of genes regulated by DNA methylation with tumor progression may reveal new possibilities to investigate new mechanisms and treatment possibilities for WT.

Here, we explored modification of DNA methylation with respect to normal tissues and associated with cis-changes of gene expression. While functional investigations of specific targets will be required to validate cancer specificity and causal relationships of epigenetic and transcriptional changes, DNA methylation signatures could be used as a tool to evaluate as tumor progression, similar to prostate cancer [61]. In addition to the *IGF2/H19* cluster, possible candidates include those genes from the HOX family and the tumor suppressors. Overall, because DNA methylation constitutes a mechanism of gene expression control, systematic investigations on how cancer cells exploit this mechanism to deregulate specific targets and processes can help us to understand the disease manifestation, by capturing and functionally implicating cancer-associated methylation events and exploiting the therapeutic opportunities [62]. In WT, the response of the lung nodules to chemotherapy is used to modify treatment intensity, with the use of an additional agent, Irinotecan, being explored as a new strategy for metastatic and relapsed WT [63].

## 5. Conclusions

The differences in DNA methylation reported for NK, WT, and MT may be a result of the differential expression of methylases and demethylases. Methylation data pointed to the existence of two groups of metastases. These methylation changes may be controlling the expression of genes related to the metastasis formation in WT. In particular, the 44 genes are candidates to be further explored as a signature for metastasis formation in WT.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/8/921/s1>, Table S1: Alignment statistics to the reference genome mapping obtained by the STAR program, for paired reads, Table S2: Alignment statistics to the reference genome mapping obtained by the STAR program, for unpaired reads, Table S3: Molecular functions enriched in differentially methylated regions between MT-Group1 and WT by the GREAT software, Table S4: Molecular functions enriched in differentially methylated regions between MT-Group2 and WT by the GREAT software, Table S5: Biological processes enriched in differentially methylated regions between MT-Group2 and WT by the GREAT software, Figure S1: Quality control for Illumina Infinium Human Methylation 450k arrays. (A) Mean detection *p*-values for each sample. (B) Density 'bean' plots (beta-values) for each sample, Figure S2: Density plots (beta-values) for raw data (left panel) and Quantile normalization procedure (right panel), Figure S3: Boxplots of gene expression levels of NK, WT, MT-Group1, and MT-Group2 per gene with negative correlated between methylation and expression.

**Author Contributions:** Contributions to the conception and design of the study: J.V.d.S.G., B.M.d.S.P., B.d.C., M.M. Identification of patients and collection of clinical data: B.M.d.S.P., R.M.d.A., P.F., B.d.C. Acquisition, analysis, and interpretation of methylation data: J.V.d.S.G., P.S.L.d.O., M.M. Acquisition, analysis, and interpretation of expression data: B.M.d.S.P., N.d.M.S., C.F., J.G.V.d.C., M.B. Authors that drafted the article: J.V.d.S.G., B.M.d.S.P. Revision of the manuscript: M.B., B.d.C., M.M. All authors read and approved the final version of this manuscript.

**Funding:** This research was funded by FAPESP 2014/10.250-7 and SwissBridge Foundation (#302403). JVSG and MM were supported by FAPESP 2015/22.758-8 and 2015/06.281-7, respectively. BSP and BDC were supported by FAPERJ (CNE 2129892016) and CNPq (306291/2014-2), respectively.

**Acknowledgments:** The authors thank MD. Sima Ferman for the support given by Pediatric Division and the Bioinformatics Core Facility (INCA-RJ) for their support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no competing interests.

## References

- de Camargo, B.; de Oliveira Ferreira, J.M.; de Souza Reis, R.; Ferman, S.; de Oliveira Santos, M.; Pombo-de-Oliveira, M.S. Socioeconomic status and the incidence of non-central nervous system childhood embryonic tumours in Brazil. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gadd, S.; Huff, V.; Huang, C.-C.; Ruteshouser, E.C.; Dome, J.S.; Grundy, P.E.; Breslow, N.; Jennings, L.; Green, D.M.; Beckwith, J.B.; et al. Clinically Relevant Subsets Identified by Gene Expression Patterns Support a Revised Ontogenic Model of Wilms Tumor: A Children's Oncology Group Study. *Neoplasia* **2012**, *14*, 742–756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Scott, R.H.; Murray, A.; Baskcomb, L.; Turnbull, C.; Loveday, C.; Al-Saadi, R.; Williams, R.; Breatnach, F.; Gerrard, M.; Hale, J.; et al. Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget* **2012**, *3*, 327–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wegert, J.; Ishaque, N.; Vardapour, R.; Geörg, C.; Gu, Z.; Bieg, M.; Ziegler, B.; Bausenwein, S.; Nourkani, N.; Ludwig, N.; et al. Mutations in the SIX1/2 Pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA Microprocessor Complex Underlie High-Risk Blastemal Type Wilms Tumors. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 298–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Torrezan, G.T.; Ferreira, E.N.; Nakahata, A.M.; Barros, B.D.F.; Castro, M.T.M.; Correa, B.R.; Krepischi, A.C.V.; Olivieri, E.H.R.; Cunha, I.W.; Tabori, U.; et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Walz, A.L.; Ooms, A.; Gadd, S.; Gerhard, D.S.; Smith, M.A.; Guidry Auvil, J.M.; Meerzaman, D.; Chen, Q.-R.; Hsu, C.H.; Yan, C.; et al. Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX Homeodomain Mutations in Favorable Histology Wilms Tumors. *Cancer Cell* **2015**, *27*, 286–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gadd, S.; Huff, V.; Walz, A.L.; Ooms, A.H.A.G.; Armstrong, A.E.; Gerhard, D.S.; Smith, M.A.; Guidry Auvil, J.M.; Meerzaman, D.; Chen, Q.R.; et al. A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nat. Genet.* **2017**, *49*, 1487–1494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Scott, R.H.; Douglas, J.; Baskcomb, L.; Huxter, N.; Barker, K.; Hanks, S.; Craft, A.; Gerrard, M.; Kohler, J.A.; Levitt, G.A.; et al. Constitutional 11p15 abnormalities, including heritable imprinting center mutations, cause nonsyndromic Wilms tumor. *Nat. Genet.* **2008**, *40*, 1329–1334. [[CrossRef](#)]
9. Maschietto, M.; Charlton, J.; Perotti, D.; Radice, P.; Geller, J.I.; Pritchard-Jones, K.; Weeks, M. The IGF signalling pathway in Wilms tumours—A report from the ENCCA Renal Tumours Biology-driven drug development workshop. *Oncotarget* **2014**, *5*, 8014–8026. [[CrossRef](#)]
10. de Sá Pereira, B.M.; Montalvão-de-Azevedo, R.; Faria, P.A.; de Paula Silva, N.; Nicolau-Neto, P.; Maschietto, M.; de Camargo, B.; Soares Lima, S.C. Association between long interspersed nuclear element-1 methylation levels and relapse in Wilms tumors. *Clin. Epigenet.* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)]
11. Charlton, J.; Williams, R.D.; Sebire, N.J.; Popov, S.; Vujanic, G.; Chagtai, T.; Alcaide-German, M.; Morris, T.; Butcher, L.M.; Guilhamon, P.; et al. Comparative methylome analysis identifies new tumour subtypes and biomarkers for transformation of nephrogenic rests into Wilms tumour. *Genome Med.* **2015**, *7*, 11. [[CrossRef](#)]
12. Dome, J.S.; Graf, N.; Geller, J.I.; Fernandez, C.V.; Mullen, E.A.; Spreafico, F.; Van Den Heuvel-Eibrink, M.; Pritchard-Jones, K. Advances in wilms tumor treatment and biology: Progress through international collaboration. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 2999–3007. [[CrossRef](#)]
13. Godzinski, J. The current status of treatment of Wilms' tumor as per the SIOP trials. *J. Indian Assoc. Pediatr. Surg.* **2014**, *20*, 16. [[CrossRef](#)]
14. Van Den Heuvel-Eibrink, M.M.; Hol, J.A.; Pritchard-Jones, K.; Van Tinteren, H.; Furtwängler, R.; Verschuur, A.C.; Vujanic, G.M.; Leuschner, I.; Brok, J.; Rube, C.; et al. Position Paper: Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol. *Nat. Rev. Urol.* **2017**, *14*, 743–752. [[CrossRef](#)]
15. Szychot, E.; Apps, J.; Pritchard-Jones, K. Wilms' tumor: Biology, diagnosis and treatment. *Transl. Pediatr.* **2014**, *3*, 12–24.
16. Maschietto, M.; Williams, R.D.; Chagtai, T.; Popov, S.D.; Sebire, N.J.; Vujanic, G.; Perlman, E.; Anderson, J.R.; Grundy, P.; Dome, J.S.; et al. TP53 mutational status is a potential marker for risk stratification in Wilms tumour with diffuse anaplasia. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ooms, A.H.A.G.; Gadd, S.; Gerhard, D.S.; Smith, M.A.; Guidry Auvil, J.M.; Meerzaman, D.; Chen, Q.R.; Hsu, C.H.; Yan, C.; Nguyen, C.; et al. Significance of TP53 mutation in Wilms tumors with diffuse anaplasia: A report from the Children's Oncology Group. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5582–5591. [[CrossRef](#)]
18. Wegert, J.; Vokuhl, C.; Ziegler, B.; Ernestus, K.; Leuschner, I.; Furtwängler, R.; Graf, N.; Gessler, M. TP53 alterations in Wilms tumour represent progression events with strong intratumour heterogeneity that are closely linked but not limited to anaplasia. *J. Pathol. Clin. Res.* **2017**, *3*, 234–248. [[CrossRef](#)]
19. Chagtai, T.; Zill, C.; Dainese, L.; Wegert, J.; Savola, S.; Popov, S.; Mifsud, W.; Vujanic, G.; Sebire, N.; Le Bouc, Y.; et al. Gain of 1q as a prognostic biomarker in Wilms Tumors (WTs) treated with preoperative chemotherapy in the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) WT 2001 trial: A SIOP renal tumours biology consortium study. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 3195–3203. [[CrossRef](#)]
20. Gratias, E.J.; Dome, J.S.; Jennings, L.J.; Chi, Y.Y.; Tian, J.; Anderson, J.; Grundy, P.; Mullen, E.A.; Geller, J.I.; Fernandez, C.V.; et al. Association of chromosome 1q gain with inferior survival in favorable-histology Wilms tumor: A report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 3189–3194. [[CrossRef](#)]
21. Cone, E.B.; Dalton, S.S.; Van Noord, M.; Tracy, E.T.; Rice, H.E.; Routh, J.C. Biomarkers for Wilms Tumor: A Systematic Review. *J. Urol.* **2016**, *196*, 1530–1535. [[CrossRef](#)]
22. Brok, J.; Pritchard-Jones, K.; Geller, J.I.; Spreafico, F. Review of phase I and II trials for Wilms' tumour—Can we optimise the search for novel agents? *Eur. J. Cancer* **2017**, *79*, 205–213. [[CrossRef](#)]
23. Wright, K.D.; Green, D.M.; Daw, N.C. Late effects of treatment for Wilms tumor. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **2009**, *26*, 407–413. [[CrossRef](#)]
24. Bal, A.S.K.; Yalcin, B.; Susam-Şen, H.; Aydin, B.; Varan, A.; Kutluk, T.; Akyüz, C. Renal late effects after the treatment of unilateral nonsyndromic wilms tumor. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **2016**, *38*, e147–e150.
25. Wong, K.F.; Reulen, R.C.; Winter, D.L.; Guha, J.; Fidler, M.M.; Kelly, J.; Lancashire, E.R.; Pritchard-Jones, K.; Jenkinson, H.C.; Sugden, E.; et al. Risk of adverse health and social outcomes up to 50 years after wilms tumor: The British childhood cancer survivor study. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 1772–1779. [[CrossRef](#)]
26. Aryee, M.J.; Jaffe, A.E.; Corrada-Bravo, H.; Ladd-Acosta, C.; Feinberg, A.P.; Hansen, K.D.; Irizarry, R.A. Minfi: A flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1363–1369. [[CrossRef](#)]

27. Nordlund, J.; Bäcklin, C.L.; Wahlberg, P.; Busche, S.; Berglund, E.C.; Eloranta, M.L.; Flaegstad, T.; Forestier, E.; Frost, B.M.; Harila-Saari, A.; et al. Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biol.* **2013**, *14*, r105. [[CrossRef](#)]
28. Touleimat, N.; Tost, J. Complete pipeline for Infinium<sup>®</sup> Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics* **2012**, *4*, 325–341. [[CrossRef](#)]
29. Leek, J.T.; Storey, J.D. Capturing heterogeneity in gene expression studies by surrogate variable analysis. *PLoS Genet.* **2007**, *3*, 1724–1735. [[CrossRef](#)]
30. Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e47. [[CrossRef](#)]
31. Smyth, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **2004**, *3*. [[CrossRef](#)]
32. Peters, T.J.; Buckley, M.J.; Statham, A.L.; Pidsley, R.; Samaras, K.; Lord, R.V.; Clark, S.J.; Molloy, P.L. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenet. Chromatin* **2015**, *8*, 6. [[CrossRef](#)]
33. McLean, C.Y.; Bristor, D.; Hiller, M.; Clarke, S.L.; Schaar, B.T.; Lowe, C.B.; Wenger, A.M.; Bejerano, G. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 495–501. [[CrossRef](#)]
34. Andrews, S. *Babraham Bioinformatics FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*; Manual; Babraham: Cambridge, UK, 2010.
35. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [[CrossRef](#)]
36. Schmieder, R.; Edwards, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 863–864. [[CrossRef](#)]
37. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21. [[CrossRef](#)]
38. Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J.; Homer, N.; Marth, G.; Abecasis, G.; Durbin, R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 2078–2079. [[CrossRef](#)]
39. Thorvaldsdóttir, H.; Robinson, J.T.; Getz, G.; Guttman, M.; Mesirov, J.P.; Winckler, W.; Lander, E.S. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 24–26.
40. Anders, S.; Pyl, P.T.; Huber, W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 166–169. [[CrossRef](#)]
41. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)]
42. Vidal, E.; Sayols, S.; Moran, S.; Guillaumet-Adkins, A.; Schroeder, M.P.; Royo, R.; Orozco, M.; Gut, M.; Gut, L.; Lopez-Bigas, N.; et al. A DNA methylation map of human cancer at single base-pair resolution. *Oncogene* **2017**, *36*, 5648–5657. [[CrossRef](#)]
43. Williams, L.A.; Mills, L.; Hooten, A.J.; Langer, E.; Roesler, M.; Frazier, A.L.; Krailo, M.; Nelson, H.H.; Bestrashniy, J.; Amatruda, J.F.; et al. Differences in DNA methylation profiles by histologic subtype of paediatric germ cell tumours: A report from the Children’s Oncology Group. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 864–872. [[CrossRef](#)]
44. Schultz, M.D.; He, Y.; Whitaker, J.W.; Hariharan, M.; Mukamel, E.A.; Leung, D.; Rajagopal, N.; Nery, J.R.; Urich, M.A.; Chen, H.; et al. Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation. *Nature* **2015**, *523*, 212–216. [[CrossRef](#)]
45. Charlton, J.; Williams, R.D.; Weeks, M.; Sebire, N.J.; Popov, S.; Vujanic, G.; Mifsud, W.; Alcaide-German, M.; Butcher, L.M.; Beck, S.; et al. Methylome analysis identifies a Wilms tumor epigenetic biomarker detectable in blood. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 434. [[CrossRef](#)]
46. Cui, H.; Hedborg, F.; He, L.; Nordenskjöld, A.; Sandstedt, B.; Pfeifer-Ohlsson, S.; Ohlsson, R. Inactivation of H19, an imprinted and putative tumor repressor gene, is a preneoplastic event during Wilms’ tumorigenesis. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4469–4473.
47. Bjornsson, H.T.; Brown, L.J.; Fallin, M.D.; Rongione, M.A.; Bibikova, M.; Wickham, E.; Fan, J.B.; Feinberg, A.P. Epigenetic specificity of loss of imprinting of the IGF2 gene in wilms tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **2007**, *99*, 1270–1273. [[CrossRef](#)]

48. Ludgate, J.L.; Le Mée, G.; Fukuzawa, R.; Rodger, E.J.; Weeks, R.J.; Reeve, A.E.; Morison, I.M. Global demethylation in loss of imprinting subtype of Wilms tumor. *Genes. Chromosomes Cancer* **2013**, *52*, 174–184. [[CrossRef](#)]
49. Conway, E.; Healy, E.; Bracken, A.P. PRC2 mediated H3K27 methylations in cellular identity and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *37*, 42–48. [[CrossRef](#)]
50. Shah, N.; Sukumar, S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 361–371. [[CrossRef](#)]
51. Lau, H.H.; Ng, N.H.J.; Loo, L.S.W.; Jasmen, J.B.; Teo, A.K.K. The molecular functions of hepatocyte nuclear factors—In and beyond the liver. *J. Hepatol.* **2018**, *68*, 1033–1048. [[CrossRef](#)]
52. Zhang, Q.; Lei, X.; Lu, H. Alterations of epigenetic signatures in hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  deficient mouse liver determined by improved ChIP-qPCR and (h)MeDIP-qPCR assays. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84925. [[CrossRef](#)]
53. Walesky, C.; Apte, U. Role of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) in cell proliferation and cancer. *Gene Expr.* **2015**, *16*, 101–108. [[CrossRef](#)]
54. Sadikovic, B.; Yoshimoto, M.; Chilton-MacNeill, S.; Thorner, P.; Squire, J.A.; Zielenska, M. Identification of interactive networks of gene expression associated with osteosarcoma oncogenesis by integrated molecular profiling. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 1962–1975. [[CrossRef](#)]
55. Lee, K.H.; Lim, S.W.; Kim, H.G.; Kim, D.Y.; Ryu, S.Y.; Joo, J.K.; Kim, J.C.; Lee, J.H. Lack of death receptor 4 (DR4) expression through gene promoter methylation in gastric carcinoma. *Langenbeck Arch. Surg.* **2009**, *394*, 661–670. [[CrossRef](#)]
56. Martinez, R.; Setien, F.; Voelter, C.; Casado, S.; Quesada, M.P.; Schackert, G.; Esteller, M. CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 1264–1268. [[CrossRef](#)]
57. Martinez, R.; Martin-Subero, J.I.; Rohde, V.; Kirsch, M.; Alaminos, M.; Fernandez, A.F.; Roperio, S.; Schockert, G.; Esteller, M. A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme. *Epigenetics* **2009**, *4*, 255–264. [[CrossRef](#)]
58. Cheng, Y.; Wang, X.; Wang, P.; Li, T.; Hu, F.; Liu, Q.; Yang, F.; Wang, J.; Xu, T.; Han, W. SUSD2 is frequently downregulated and functions as a tumor suppressor in RCC and lung cancer. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 9919–9930. [[CrossRef](#)]
59. Watson, A.P.; Evans, R.L.; Eglund, K.A. Multiple Functions of Sushi Domain Containing 2 (SUSD2) in Breast Tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* **2012**, *11*, 74–85. [[CrossRef](#)]
60. Zhang, S.; Zeng, N.; Alowayed, N.; Singh, Y.; Cheng, A.; Lang, F.; Salker, M.S. Downregulation of endometrial mesenchymal marker SUSD2 causes cell senescence and cell death in endometrial carcinoma cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0183681. [[CrossRef](#)]
61. Zhao, S.; Geybels, M.S.; Leonardson, A.; Rubicz, R.; Kolb, S.; Yan, Q.; Klotzle, B.; Bibikova, M.; Hurtado-Coll, A.; Troyer, D.; et al. Epigenome-wide tumor DNA methylation profiling identifies novel prognostic biomarkers of metastatic-lethal progression in men diagnosed with clinically localized prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 311–319. [[CrossRef](#)]
62. Saghafinia, S.; Mina, M.; Riggi, N.; Hanahan, D.; Ciriello, G. Pan-Cancer Landscape of Aberrant DNA Methylation across Human Tumors. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 1066–1080. [[CrossRef](#)]
63. Oostveen, R.M.; Pritchard-Jones, K. Pharmacotherapeutic Management of Wilms Tumor: An Update. *Pediatr. Drugs* **2019**, *21*, 1–13. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Non-coding RNAs in Wilms' tumor: biological function, mechanism, and clinical implications

Bruna Maria de Sá Pereira<sup>1</sup> · Rafaela Montalvão de Azevedo<sup>1,2</sup> · João Victor da Silva Guerra<sup>3,4</sup> · Paulo A. Faria<sup>1</sup> · Sheila Coelho Soares-Lima<sup>1</sup> · Beatriz De Camargo<sup>1</sup> · Mariana Maschietto<sup>3,5</sup>

Received: 10 September 2020 / Revised: 4 March 2021 / Accepted: 6 April 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

### Abstract

Non-coding RNAs are involved with maintenance and regulation of physiological mechanisms and are involved in pathological processes, such as cancer. Among the small ncRNAs, miRNAs are the most explored in tumorigenesis, metastasis development, and resistance to chemotherapy. These small molecules of ~ 22 nucleotides are modulated during early renal development, involved in the regulation of gene expression and Wilms' tumor progression. Wilms' tumors are embryonic tumors with few mutations and complex epigenetic dysregulation. In recent years, the small ncRNAs have been explored as potentially related both in physiological development and in the tumorigenesis of several types of cancer. Besides, genes regulated by miRNAs are related to biological pathways as PI3K, Wnt, TGF- $\beta$ , and Hippo signaling pathways, among others, which may be involved with the underlying mechanisms of resistance to chemotherapy, and in this way, it has emerged as potential targets for cancer therapies, including for Wilms' tumors.

**Keywords** Small non-coding RNAs · MicroRNAs · Cell signaling pathways · Wilms' tumor · Gene expression regulation

### Introduction

Non-coding RNAs (ncRNAs) are functional RNA molecules not translated into proteins that play roles related to regulatory nucleic acids [1]. They are involved in the control of normal development and in a variety of cellular functions even though alterations in their expression were described for several types of cancers. Somatic mutations, epigenetic regulation,

transcriptional and post-transcriptional modifications can alter ncRNAs expression and function, which were associated with cancer development, progression, and resistance to treatment [2]. ncRNAs are divided into long non-coding RNAs (lncRNAs) and small non-coding RNAs (sncRNAs). SncRNA includes, in addition to other subgroups, the microRNAs (miRNAs), widely associated with gene silencing, such as tumor suppressor genes in the context of cancer

✉ Mariana Maschietto  
marianamasc@gmail.com

Bruna Maria de Sá Pereira  
brunamspereira@yahoo.com

Rafaela Montalvão de Azevedo  
rafaela\_montalvao@yahoo.com.br

João Victor da Silva Guerra  
jvsguerra@gmail.com

Paulo A. Faria  
paulofaria@gmail.com

Sheila Coelho Soares-Lima  
sheilacoelho@gmail.com

Beatriz De Camargo  
bdecamar@terra.com.br

<sup>1</sup> Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>2</sup> Current institution: Molecular Bases of Genetic Risk and Genetic Testing Unit, Research Department, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy

<sup>3</sup> Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, SP, Brazil

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

<sup>5</sup> Current: Research Institute, Boldrini Children's Hospital, Rua Dr. Gabriel Porto, 1270 - Cidade Universitária, Campinas, SP 13083-210, Brazil

[3, 4]. Physiologically, miRNAs are involved in kidney development, maintenance of homeostasis, and control of physiological functions [5–7].

Wilms' tumor (WT) is the commonest renal cancer in childhood [8], being an example of therapeutic success in pediatric oncology with survival rates reaching 90% in 5 years [9, 10]. The multidisciplinary treatment standardized by the International Renal Tumor Study Group (RTSG-SIOP) proposes the administration of preoperative chemotherapy, followed by surgery and chemotherapy according to risk classification, which is based on tumor response to the preoperative chemotherapy [11, 12]. Classical WT histology comprises a triphasic pattern of epithelial, stromal, and blastemal components, present in variable proportions [13]. Tumor histology and staging are the most powerful prognostic factor for WTs [11, 14]; blastemal predominance after preoperative chemotherapy indicates chemoresistance and a higher risk of relapse, which classifies these tumors in the high-risk group [15–17]. Treatment protocols are designed not only to increase survival and reduce toxicity and late treatment effects [18, 19], but also to provide new paths for the early identification of high-risk cases, a challenge for treatment stratification [20].

The accumulation of knowledge of molecular alterations and mechanisms have allowed several types of cancer to be classified into subgroups; however, this subclassification is yet to be deepened and understood for WT. The low frequency of somatic alterations, identified in approximately 30% of WT cases [21, 22], includes mutations in genes belonging to miRNA biogenesis machinery: *DROSHA*, *DICER*, *DGCR8*, *XPO1*, *DIS3L2*, and *TARBP2* [23–28] as well as the gain of the lncRNA *LIN28B* [22], suggesting a role of this epigenetic mechanism in Wilms' tumorigenesis. Furthermore, aberrant miRNA expression was associated with treatment response and prognosis in WTs with blastemal predominance [29]. WTs present mutations in genes other than those associated with ncRNA alterations, including *WT1*, *CTNNB1*, *AMER1*, *SIX1*, *SIX2*, *MLL1*, and *TP53* as well as *MYCN* amplification [21, 22, 30]. Other genes found in lower number of cases include *BCOR*, *BCORL1*, *NONO*, *MAX*, *COL6A3*, *ASXL1*, *MAP3K4*, *ARID1A*, *TRIM28*, and *FBXW7* [22, 30]. In this review, we will explore the role of sncRNAs, focusing on miRNAs in the development, progression, metastasis, and treatment resistance in WTs, discussing the possible implications of their dysregulation in diagnosis, prognosis, and their role as possible biomarkers in WTs.

## Function and mechanism of ncRNAs

Genes that encode proteins cover only a fraction of the human transcriptome, with a large portion consisting of ncRNAs and pseudogenes [31–33]. ncRNAs act as a link between the environment and the genome, modulating gene expression and,

thus, contributing to the pathogenesis of cancer, including pediatric cancers such as osteosarcoma, rhabdomyosarcoma [34–36], brain tumors [37], and WT [29, 34, 38].

lncRNAs comprise RNAs composed of > 200 nucleotides (nt), which participates in several mechanisms that regulate transcription and post-transcriptional processes [39]. These molecules interact with mRNA, DNA, protein, and miRNA regulating gene expression at the epigenetic, transcriptional, post-transcriptional, translational, and post-translational levels [40]. Well-known processes regulated by lncRNAs include the X-chromosome inactivation, genome *imprinting*, immune response, cell cycle regulation, genome stability, lineage commitment, and embryonic stem cell pluripotency [41–46]. Besides, *HOTAIR*, a lncRNA that recruits histone modification complexes, acts in the mechanism of histone modifications [47]. Such processes may be associated with tumor progression, invasion, angiogenesis, and metastasis [32, 48, 49], and therefore, these molecules have emerged as potential targets for cancer therapies. However, the specific mechanisms of aberrant expression of lncRNAs in tumor cells remain unclear and their role in WT is yet poorly understood.

sncRNAs are composed of 18–200 nt that regulate gene expression by binding with target mRNAs [50, 51] affecting chromatin structure, RNA editing, translation, transcription, and splicing [52]. Although miRNAs, piwi-interacting RNAs (piRNAs), and small interfering RNAs (siRNAs) had their function investigated in these processes, there are other sncRNAs involved in RNA processing, such as snRNA (small nuclear RNA) and the snoRNA (small nucleolar RNA) [50, 53]. siRNAs are sequences of 20–25 nt, linear, and base-paired double-stranded RNA that act to preserve genomic integrity in response to foreign nucleic acids, such as viral pathogens, transposons, and repetitive elements as well as regulating genome functions [53, 54]. The double-stranded siRNAs are processed by DICER into single-stranded mature siRNA that activates the RNA-induced silencing complex (RISC) by directing the target mRNA for degradation. In humans, this degradation is induced by the piwi domain of Argonaute-2 (*AGO2*) in the cytoplasm, with the pairing of siRNAs with their respective targets occurring by partial complementarity, leading to translational repression or exonucleolytic degradation [54, 55].

Mature piRNAs are highly diverse between organisms, even between related species, sharing few characteristics in addition to the interaction with PIWI proteins [56]. In vertebrates, these sequences are composed by 24–32 nt, with biogenesis pathways between organisms differing from those of other sncRNAs. These sequences are involved with the maintenance of genomic stability in germ cells and, in mammals, have a crucial role acting during embryonic development and silencing transposable elements involved in spermatogenesis, by promoting transcript degradation and regulating chromatin formation [57–61]. PiRNAs also guide PIWI proteins to

cleave target RNAs, to promote heterochromatin assembly and DNA methylation [60, 62], and to act in the regulation of the cell cycle of mesenchymal stem cells [63]. Although studies about these molecules are scarce, there is growing evidence that piRNAs and PIWI proteins are expressed in cancers, opening a new field of study for these molecules as potential biomarkers and therapeutic targets [64, 65]. According to our knowledge, so far, there are no studies describing specific piRNA functions in WT development or progression.

The siRNAs are composed by 22–24 nt and are responsible for the RNA interference (RNAi) phenomenon or transcriptional gene silencing, acting in DNA methylation mechanism, inhibiting gene transcription, or, in some cases, leading to degradation of mRNA molecules [66–68]. Both miRNAs and siRNAs are generated by the same biochemical processes and are involved in gene expression regulation. However, both classes of molecules differ in their origin, processing and their relationship with protein complexes, and consequently, in the way these molecules act. The siRNAs originate from exogenous RNAs and their binding to target mRNAs depends on a perfect base pairing, whereas miRNAs are expressed products by an organism's own genome and their binding to target mRNAs is less specific [54].

The most well-studied sncRNAs are the miRNAs, composed by 18–22 nt, that target specific mRNA regulating their expression level by leading to degradation or transcriptional repression, depending on the level of complementarity [50, 69, 70]. MiRNAs seem to regulate the expression of ~50% of the genes at the post-transcriptional level [71], playing a role in the modulation of several physiological and pathological processes that range from embryonic development to neoplastic progression [70].

MiRNAs are transcribed in the nucleus by RNA polymerase II into a long molecule (> 100 nt), called primary miRNA (pri-miRNA) [72]. The pri-miRNAs are cleaved by a complex formed by the nuclear RNase III DROSHA and its cofactor, the RNA-binding protein DGCR8 (DGCR8 Microprocessor Complex Subunit), resulting in a hairpin structure molecule of 70–100 nt, called precursor miRNA (pre-miRNA) [73, 74]. Pre-miRNAs are exported to the cytoplasm by exportin-5 (XPO5) [75], where they are cleaved by the RNase III DICER resulting in mature miRNA duplexes with ~22 nt [76]. The double-stranded miRNA binds to AGO2 as described above [77] and then pair with target mRNAs, usually at the 3' untranslated region (UTR), to guide their translational repression or deadenylation and degradation [72, 74, 78]. Beyond this classical role, miRNAs can also regulate gene expression by targeting gene promoters [79].

In cancer, alterations in miRNA expression may occur by amplification or deletion of genes encoding miRNAs, abnormal transcriptional control of miRNAs, alterations of epigenetic mechanisms, and defects in the miRNA biogenesis

machinery [80, 81]. Furthermore, miRNAs can also act as oncogenes (or oncomiRs) or tumor suppressors, depending on the cellular context [82]. Large-scale expression studies reported that miRNA expression patterns can be associated with cancer type, stage, and other clinical and pathological variables [80, 83, 84]. The large number of deregulated miRNAs in several cancers in addition to the characteristic of targeting hundreds of genes points to their role in all the cancer hallmarks: sustained angiogenesis, ability to invade and metastasize, acquisition of enhanced growth potential, and decreased cell death [85].

Due to their high stability, probably related to the small size, miRNAs can be detected in blood and tissue samples from patients with cancer, and thus, they are explored as potential biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapeutic targets [86]. This has already been demonstrated for ovarian [87], gastric [88], renal cell carcinomas [89], and also for pediatric cancers [34], including acute lymphoblastic leukemia [90], neuroblastoma [91], and WT [92]. Moreover, miRNAs were associated with acquired resistance to some drugs, as those blocking the ERBB2/HER tyrosine kinases and epidermal growth factor receptor (*EGFR*) signaling [93]. Since a single miRNA targets multiple genes, it might have tissue-specific regulatory roles and modulates a variety of cancer-related pathways, including cell proliferation, cell cycle, and apoptosis as well as regulation of drug resistance-related gene [94]. The pattern of miRNA expression was correlated with chemoresistance in several cancer types, such as breast, ovarian, gastric, colon, prostate, neuroblastoma, and pediatric leukemia, among others [95–97]. Conversely, the mechanisms underlying the acquired resistance to chemotherapeutic drugs mediated by miRNAs need to be further explored, especially in pediatric tumors.

Among the ncRNAs, circular RNAs (circRNAs) are involved in regulation of biological processes, such as splicing [98], and may be involved in cancer progression [99, 100] due to their role in proliferation and chemosensitivity in several types of cancer [101, 102]. These molecules act as sponges of miRNAs, RNA-binding protein sequestering agents, and transcriptional regulators, thus being explored as potential therapeutic targets [36, 103–106]. Nevertheless, although studies on pediatric tumors are still lacking, there are evidences of circRNA involvement with neuroblastoma [107], ependymoma [108], hepatoblastoma [109], and pediatric acute lymphoblastic leukemia [110].

All ncRNAs can potentially turn into circulating RNAs by physiological or pathological mechanisms. These comprise ideal biomarkers for non-invasive tests (also named liquid biopsy) as they present high specificity and sensitivity [111]. Among them, miRNAs can be found in the plasma [112] and urine [113, 114], increasing their potential utility for clinical practices such as non-invasive diagnostic tools [115–118], including for pediatric tumors, such as

leukemia [119], neuroblastoma [91], astrocytoma [120], and WT [34, 92, 121].

### The involvement of miRNAs in kidney development

ncRNAs are involved with gene expression regulation during kidney development, from nephrogenesis to senescence, acting both in physiological and pathological conditions, including polycystic disease, diabetic nephropathy, nephrogenic diabetes insipidus, hypertension, kidney fibrosis, and cancer [122, 123]. The intermediate mesoderm gradually gives rise to metanephric mesenchymal cells and ureteric bud that will culminate in the kidney, all orchestrated by complex molecular regulatory actions [124, 125]. During this process, suppression of *DICER1* in the progenitor cells and the ureteric bud-derived collecting duct cells results in increased apoptosis and premature interruption of nephrogenesis, followed by development of renal cysts. This implies that *DICER1* plays a critical role in maintaining the viability and differentiation of nephron progenitors [5].

Among the ncRNAs, miRNAs were more commonly explored during kidney development. In vivo data showed that loss of miR-10a, miR-106b, and miR-17-5p during nephron progenitor differentiation result in the decrease of the number of nephrons [126, 127]. Likewise, depletion of *DROSHA* reduced the nephron number by interrupting their maturation process [128] while loss of *DGCR8* results in kidney malformation [129]. In addition to changes in the miRNA profiles as consequence of alterations in miRNA-processing machinery genes, specific miRNAs have also been involved in kidney malformation [130]. Following *Dicer1* inactivation in a mouse model, several anomalies were observed in the glomeruli that ultimately resulted in kidney failure. Gene expression data suggested that miR-30 family members were involved with podocyte homeostasis and pathology [131]. Finally, absence of Droscha in a mouse model suggested that the continuous generation of miRNAs are required for the normal function of mature podocytes [128]. Taken together, this evidence strongly suggests that the regulatory role of miRNAs is important for renal development.

Therefore, since WTs arise from the interruption of metanephric mesenchyme differentiation [132] and that genes involved with miRNA biogenesis are mutated in these tumors, we can infer that their alterations can result in failures in development and maintenance of renal architecture, possibly being associated with WT development [133, 134].

### Genetic alterations affect sncRNA regulation in Wilms' tumors

WT presents mutations in *DICER1*, *DROSHA*, and other genes related to miRNA biogenesis. Biallelic mutations in

*DICER1* were first reported in 2.6% of WT sporadic cases [24], and later, somatic mutations were identified in *DROSHA* (14%) and *DICER1* (7%) by whole-exome sequencing of 44 WT samples. These mutations were associated with expression impairment of some tumor-suppressing miRNAs, including those from let-7 family, regulators of WT oncogenes [25]. *DROSHA* somatic mutations were identified in 12% (out of 222 cases) of WT. The recurrent E1147K that affects a metal-binding residue of the RNase IIIb domain comprised 80% of the mutation and was associated to the downregulation of a subset of mature miRNAs by affecting the processing of primary miRNAs. In addition, non-recurrent somatic mutations in other genes of miRNA processing, such as *DGCR8*, *DICER1*, *XPO5*, and *TARBP2*, were identified [26]. Although mutations in some of these genes impair kidney development and function, they are not sufficient for WT formation, requiring additional alterations to induce malignant transformation [135].

Mutations in *DGCR8/DROSHA* (15%) were also described in WTs with favorable histology from patients that had surgery upfront treatment, following COG protocol, together with somatic mutations in *SIX1/2* (7%) that belong to the Homeobox family. The co-occurrence of *SIX1/2* and miRNA processing gene mutations within a tumor was associated with RAS activation, higher risk of relapse, and death. Moreover, *DGCR8* and *DROSHA* mutations as well as mature Let-7a and the miR-200 family downregulation, which acts in the epithelial-mesenchymal transition (EMT), were associated with blastemal predominance [27]. These same alterations were identified by exome and transcriptome sequencing in high-risk tumors (blastemal predominance), treated with pre-operative chemotherapy, indicating an adverse prognosis and chemoresistance, where mutations in *SIX1/2*, *DGCR8*, and *DROSHA* were identified in 18% of the cases, in addition to mutations in *DICER1* and *DIS3L2* [28]. Similar frequencies of somatic mutations were reported by a study that explored the genetic landscape of 651 WT cases [22].

*LIN28* encodes a protein that can regulate gene expression through negative regulation of the Let-7 miRNA family [136, 137]. *LIN28* over-expression is required for the expansion of kidney progenitor cells, but the maintenance of its expression resulted in WT formation by downregulating miR-let-7 in a mouse model [138]. *LIN28* is highly expressed at the beginning of the embryonic development and decreases throughout this process being considered a potent mediator of differentiation [139]. High expression of *LIN28* is reported in up to a third of WT, mainly in high-risk cases composed by blastemal cells that persisted after chemotherapy, suggesting that *LIN28* upregulation may be a marker of chemotherapy resistance [30, 138].

The dysregulation of LIN28/miR-let-7 axis has also been reported to be involved in Wilms' tumorigenesis by the discovery of mutations in genes that predispose to WT, such as

the 3'-5' exonuclease *DIS3L2* (Perlman syndrome) involved with let-7 degradation mediated by *LIN28* [140].

### MiRNA dysregulation is common in Wilms' tumors and is associated with therapy resistance

ncRNAs are involved in the regulation and maintenance of many epigenetic and post-translational mechanisms related to tumorigenesis, metastasis development, and resistance to treatment both in adult and childhood cancers [38, 141, 142]. Among the ncRNAs, miRNAs were commonly investigated in WT (Table 1). This association was initially reported by the activation of the E2F3-Oncomir-1 axis in WTs compared to other kidney tumors, WT also reported a distinct gene and miRNA expression profile [143]. Some cases of WT present 2q37 deletion that result in miR-562 downregulation. These miRNAs target *EYAI*, a gene critical for renal development and, thus, increasing the risk for WT development [144].

Expression of miRNAs related to EMT and by acting in regulatory signaling pathways during renal development, such as miR-17-92, miR-200, and miR-205, were associated with WTs and other kidney diseases [124]. The tumor suppressor miR-185 over/down-expression that targets *SLX1* was reported in WT [145]. MiR-192, miR-215, and miR-194 presented a lower expression in WTs, compared to normal kidney, independently of histological subtype, while miR-141 and miR-200c were less expressed in blastema compared to other histologies. All these miRNAs are involved with the regulation of the TGF- $\beta$  signaling pathway, also found altered in WT [29]. Finally, over-expression of miR-21 promotes a more aggressive behavior in WT cells through negative regulation of *PTEN*, suggesting that this miRNA can be used as a predictive biomarker of tumor progression and worse prognosis [146, 147].

MiRNA expression profile of patients treated under the SIOP protocol identified chemoresistant blastemal cells in high-risk WTs, which could be a predictive marker of response to treatment. Intermediate- and high-risk tumors can be discriminated by miRNA profiling. Seven miRNAs (miR-193a.5p, miR-27a, miR-483.5p, miR-628.5p, miR-590.5p, miR-302a, and miR-367) were differentially expressed between risk groups in pretreatment biopsies, indicating possible markers of treatment resistance in WTs [148].

Circulating miRNAs have also been proposed as a possible non-invasive method of diagnosis in patients with solid tumors [121]. To identify miRNAs that might be able to distinguish WTs from control samples, 19 miRNAs previously described as dysregulated in WT were analyzed in the serum of 32 patients with WT, without chemotherapeutic treatment, with miR-100-5p and miR-130b-3p being proposed as potential biomarkers of diagnosis, regardless of the subtype [92].

By comparing WT histological subtypes with normal kidneys, 85 differentially expressed miRNAs were identified in blastemal WT and 266 differentially expressed miRNAs in the regressive subtype, suggesting that miRNA profiles have the potential to stratify WT subtypes. MiR-183, miR-301a/b, and miR-335 were over-expressed exclusively in the blastemal subtype, postulating that changes in specific miRNAs are associated with tumor histology [149].

A discussion that includes the role of miRNA and genes involved with WT in the signaling pathway context may help to advance the understanding of mechanisms associated with development, progression, and resistance to treatment of WT, similar to other pediatric solid tumors [150].

### The impact of miRNAs associated with the regulation of biological pathways related to treatment resistance in WT

Coordinated RAS activation, from PI3K/AKT pathway, and  $\beta$ -catenin, from Wnt pathway, accelerate the growth and metastatic progression in a murine WT model [151, 152]. Activating *KRAS* mutations found in WT suggests that, at least in part, Wilms' progression depends on PI3K/AKT activation, pointing to the possibility of targeting this pathway for WT treatment [153]. MiR-155-5p is a potential oncomiR in some types of tumors [154–156]; however, in WT, miR-155-5p acts as tumor suppressor by directly targeting *IGF2* resulting in inactivation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [157]. In this context, cabozantinib, a pan tyrosine kinase inhibitor, was tested in a phase I study that included patients with recurrent or refractory solid tumors, including WTs, yielding promising results. Currently, this study followed a phase II trial to further evaluate the activity of this compound [158].

The involvement of Wnt signaling pathway in the earliest events of WT include the participation of *WT1*, *AMER1*, and *CTNNB1*, recurrently mutated in WT [152, 159, 160]. Some studies have shown that specific miRNAs can regulate target genes involved in the Wnt signaling, such as miR-128-3p that induces mesenchymal and stemness-like properties through downregulating multiple inhibitors of Wnt/ $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$  pathways. Conversely, inhibition of miR-128-3p reversed metastasis and chemoresistance of highly malignant non-small cell lung cancer cells, which was reversed by restoring Wnt/ $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$  activities, suggesting that miR-128-3p may be a valuable target against both metastasis and chemoresistance [161]. Regarding other pediatric tumors, such as hepatoblastoma, the Wnt signaling pathway has also been explored as a potential therapeutic target focusing on miRNAs [162].

In cancers, several miRNAs target the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway to regulate EMT [163]. Disruption of EMT leads to uncontrolled cell proliferation, invasion, and metastatic

**Table 1** Altered miRNAs reported in WTs

miRNA	Wilms tumor/ kidney development	Other embryonic tumors	Refs.
Let-7 family	Over-expression was associated with kidney development and Wilms tumorigenesis	Loss of let-7 associated with poor outcomes in NB; Related to the aggressive metastatic behavior of ES	[138, 140, 180, 181]
Let-7a	Down-regulation associated with blastemal histology	Dysregulation of let-7a related to ES development	[27, 182]
miR-10a	Associated with a premature decrease of nephron progenitors, increased apoptosis and premature interruption of nephrogenesis	N/A	[126]
miR-17-5p	Associated with a premature decrease of nephron progenitors, increased apoptosis and premature interruption of nephrogenesis	Over-expression related to lower EFS in ET	[126, 183]
Cluster miR-17-92	Upregulation in WT compared to other kidney tumors and NT	Over-expression enhanced cell proliferation and promoted tumorigenesis in NB cell lines; Lower expression of miR-17-5p in fetal subtype of HB compared to surrounding NT; Up-regulation of miR-17-5p and miR-19a-3p was associated with advanced ET	[124, 183–185]
miR-21	Over-expression relative to NT was associated with progression and worse prognosis	Up-regulation was independently associated with increased overall survival in HB	[146, 147, 184]
miR-27	Down-regulation in high-risk compared to intermediate-risk WT cases	Up-regulation of miR-27-3p induced OS cell growth	[148, 186]
miR-100-5p	Higher expression in serum of patients with nephroblastoma compared to healthy controls	N/A	[92]
miR-106b	Associated with a premature decrease of nephron progenitors, increased apoptosis and premature interruption of nephrogenesis	Associated with the progression of EP, possible prognostic marker	[126, 183]
miR-130b-3p	Higher expression in serum of patients with nephroblastoma compared to healthy controls	N/A	[92]
miR-141	Down-regulated in blastemal tumors and mixed-type compared with NT	N/A	[29]
miR-181b	Over-expressed in the regressive subtype WT compared with NT	miR-181a/b up-regulation induced growth, invasion, and metastasis of NB cells	[149, 187]
miR-183	Over-expressed in the blastema subtype WT compared with NT	N/A	[149]
miR-185	Down-regulation associated with higher risk of WT development	Down-regulation inhibited proliferation, migration and invasion of OS cells.	[145, 188]
miR-192	Lower expression in WTs compared to NT	Over-expression inhibited proliferation of MB cells; Over-expression reduced proliferation, migration and invasion, and promoted apoptosis of OS cells	[29, 189–191]
miR-193a-5p	Down-regulation in high-risk compared to intermediate-risk WT cases	N/A	[148]
miR-194	Down-regulation in WTs compared to NT	Over-expression attenuated the proliferation and migration and induced the apoptosis of OS cells	[29, 192]
miR-200 family	Down-regulation associated with blastemal histology	N/A	[27]
miR-200c	Down-regulated in blastemal tumors and mixed-type compared with NT	Up-regulation related to OS progression and metastasis	[29, 193]
miR-215	Down-regulated in WTs compared to NT	N/A	[29]
miR-223	Over-expressed in the regressive subtype WT compared with NT	miR-223-5p differentially expressed in OS compared to NT and related to tumorigenesis and pulmonary metastasis; miR-223-3p over-expressed in NB cell lines compared to normal cells, promoted NB progression; miR-223 related to an axis that modulates the chemoresistance to cisplatin in OS	[149, 194–196]
miR-301a/b	Over-expressed in the blastema subtype WT compared with NT	N/A	[149]

**Table 1** (continued)

miRNA	Wilms tumor/ kidney development	Other embryonic tumors	Refs.
miR-302a	Up-regulation in high-risk compared to intermediate-risk WT cases	N/A	[148]
miR-335	Over-expressed in the blastema subtype WT compared with NT	Down-regulation correlated with poor overall survival of NB patients; Over-expression inhibited the migration and invasion of OS cells;	[149, 197, 198]
miR-367	Up-regulation in high-risk compared to intermediate-risk WT cases	Putative biomarker of early diagnosis and prognosis prediction in aggressive embryonal CNS tumors; Over-expression contributing to a possible mechanism of tumor aggressiveness in MB	[148, 199, 200]
miR-483-5p	Up-regulation in high-risk compared to intermediate-risk WT cases	Over-expression was associated with poor outcome in HB	[148, 201]
miR-562	Down-regulation associated with higher risk of WT development	N/A	[144]
miR-590-5p	Up-regulation in high-risk compared to intermediate-risk WT cases	N/A	[148]
miR-628-5p	Up-regulation in high-risk compared to intermediate-risk WT cases	N/A	[148]
miR-630	Over-expressed in the regressive subtype WT compared with NT	N/A	[149]

CNS Central nervous system; EP Ependymoma; HB Hepatoblastoma; MB Medulloblastoma; NB Neuroblastoma; OS Osteosarcoma; NT Normal tissue; WT Wilms tumor; ES Ewing Sarcoma; EFS Event-free survival; N/A Not Available

development, and was involved with WT [164]. Similarly, several miRNAs were related to this perturbation in WT, such as miR-29a, miR-200b, and miR-218 that target *TP53* and *MYCN*, genes also altered in WT. Among the involved pathways, the Hippo signaling pathway, poorly investigated in WT, is regulated by *YAP1*, targeted by several miRNAs associated with EMT in other cancers [165, 166]. *YAP1* interacts with *ZEB1*, a regulator of EMT, suggesting that these genes and pathway should be explored in WT [167]. In this way, the miR-200 family was highlighted as a *YAP1* master regulator [168].

Based on the current knowledge regarding miRNAs in the regulation of several signaling pathways related to Wilms' tumorigenesis, we highlight that studies involving miRNAs in WT are a field to be explored, as well as the regulatory mechanisms associated with changes in miRNAs and other non-coding RNAs, especially regarding WT subtypes.

## Conclusions

We can expect that the increasing knowledge related to ncRNAs, especially miRNAs, and of genes from miRNA biogenesis will clarify their impact in Wilms' tumorigenesis, progression, and treatment resistance. Current treatments have reached the limits of toxicity sometimes resulting in long-term late effects or affecting the effectiveness for high risk tumors [169]. Hence, the disclosure of cellular pathways, and genes, altered in association with miRNAs may help to

point to new biomarkers useful for diagnosis, risk stratification, prediction of response to treatment, and drug targeting.

A limitation for this review is the lack of studies exploring ncRNAs in nephrogenic rests, as they are considered precursor lesions of WT, although a significant proportion of the cells finish their differentiation or undergo apoptosis. Only small cohorts of WT have been evaluated for ncRNA profiles and few ncRNAs were evaluated in a significant number of cases together with functional studies to define their role in Wilms' tumorigenesis and progression. Consequently, findings related to possible new therapeutic options were discussed regarding the cellular pathways with which some miRNAs were involved, rather than the impact of these miRNAs on resistance to chemotherapy.

Since genetic alterations are observed only in a small proportion of WT cases, epigenetic alterations emerge as likely mechanisms to contribute to tumor development and resistance to therapy. These mechanisms play a crucial role in embryogenesis and in the establishment of cell identity [170, 171], two processes highly associated with WT development. Although alterations in DNA methylation have already been reported in WT [172–177], the dysregulation of miRNA profiles seems to be especially interesting, since it seems to be mediated both by genetic alterations and other mechanisms yet to be elucidated. Finally, the impact of miRNA dysregulation on cell signaling pathways involved with both, WT and tumor resistance, represents not only the possibility of evaluating a highly stable single molecule for predicting complex

tumor phenotypes, but also potential alternative therapeutic targets for overcoming resistance.

**Author contribution** MM and BDC had the idea for the article; BMSP, RMA, JVSG, and PAF performed the literature search and data analysis; BMSP, JVSG, and SCSL drafted; and MM critically revised the work.

**Funding** BMSP and RMA were supported by Ministério da Saúde; BDC has a fellowship from CNPq 306291/2014-2; and MM was supported by FAPESP 2015/06281-7. The study was funded by SwissBridge 302403, FAPERJ E-26/200.069/2016 (both to BDC), and FAPESP 2014/10250-7 (MM).

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

## References

- Piket E, Zheleznyakova GY, Kular L, Jagodic M (2019) Small non-coding RNAs as important players, biomarkers and therapeutic targets in multiple sclerosis: A comprehensive overview. *J Autoimmun* 101. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.04.002>
- Corrà F, Agnoletto C, Minotti L et al (2018) The network of non-coding RNAs in cancer drug resistance. *Front Oncol*
- Lu J, Getz G, Miska EA et al (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
- Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S (2017) Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem*. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i1.45>
- Nagalakshmi VK, Ren Q, Pugh MM et al (2011) Dicer regulates the development of nephrogenic and ureteric compartments in the mammalian kidney. *Kidney Int*. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.385>
- Gowrishankar B, Ibragimova I, Zhou Y et al (2014) MicroRNA expression signatures of stage, grade, and progression in clear cell RCC. *Cancer Biol Ther*. <https://doi.org/10.4161/cbt.27314>
- Marrone AK, Stolz DB, Bastacky SI et al (2014) MicroRNA-17~92 is required for nephrogenesis and renal function. *J Am Soc Nephrol*. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013040390>
- Stiller CA, Parkin DM (1990) International variations in the incidence of childhood renal tumours. *Br J Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.1990.432>
- Wang J, Li M, Tang D et al (2019) Current treatment for Wilms tumor: COG and SIOP standards. *World J Pediatr Surg*. <https://doi.org/10.1136/wjps-2019-000038>
- Pritchard-Jones K, Bergeron C, De Camargo B et al (2015) Omission of doxorubicin from the treatment of stage II-III, intermediate-risk Wilms' tumour (SIOP WT 2001): An open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62395-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62395-3)
- Dome JS, Perlman EJ, Graf N (2014) Risk stratification for Wilms tumor: current approach and future directions. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. [https://doi.org/10.14694/edbook\\_am.2014.34.215](https://doi.org/10.14694/edbook_am.2014.34.215)
- Dome JS, Graf N, Geller JI et al (2015) Advances in Wilms tumor treatment and biology: Progress through international collaboration. *J Clin Oncol*
- Beckwith JB, Zuppan CE, Browning NG et al (1996) Histological analysis of aggressiveness and responsiveness in Wilms' tumor. *Med Pediatr Oncol*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-911X\(199611\)27:5<422::AID-MPO6>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-911X(199611)27:5<422::AID-MPO6>3.0.CO;2-O)
- Kaste SC, Dome JS, Babyn PS et al (2008) Wilms tumour: Prognostic factors, staging, therapy and late effects. *Pediatric Radiology*, In
- Weirich A, Leuschner I, Harms D et al (2001) Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. *Ann Oncol*. <https://doi.org/10.1023/A:1011167924230>
- Vujančić GM, Sandstedt B, Harms D et al (2002) Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol*. <https://doi.org/10.1002/mpo.1276>
- Van Den Heuvel-Eibrink MM, Van Tinteren H, Bergeron C et al (2015) Outcome of localised blastemal-type Wilms tumour patients treated according to intensified treatment in the SIOP WT 2001 protocol, a report of the SIOP Renal Tumour Study Group (SIOP-RTSG). *Eur J Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.12.011>
- Sonn G, Shortliffe LMD (2008) Management of Wilms tumor: Current standard of care. *Nat Clin Pract Urol*
- Van Den Heuvel-Eibrink MM, Hol JA, Pritchard-Jones K et al (2017) Position Paper: Rationale for the treatment of Wilms tumour in the UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 protocol. *Nat Rev Urol*. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.163>
- Metzger ML (2005) Current therapy for Wilms' tumor. *Oncologist*. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.10-10-815>
- Scott RH, Murray A, Baskcomb L et al (2012) Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.468>
- Gadd S, Huff V, Walz AL et al (2017) A children's oncology group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nat Genet*. <https://doi.org/10.1038/ng.3940>
- Astuti D, Morris MR, Cooper WN et al (2012) Germline mutations in *DIS3L2* cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility. *Nat Genet*. <https://doi.org/10.1038/ng.1071>
- Wu MK, Sabbaghian N, Xu B et al (2013) Biallelic *DICER1* mutations occur in Wilms tumours. *J Pathol*. <https://doi.org/10.1002/path.4196>
- Rakheja D, Chen KS, Liu Y et al (2014) Somatic mutations in *DROSHA* and *DICER1* impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/ncomms5802>
- Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM et al (2014) Recurrent somatic mutation in *DROSHA* induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/ncomms5039>
- Walz AL, Ooms A, Gadd S et al (2015) Recurrent *DGCR8*, *DROSHA*, and *SIX* homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.01.003>
- Wegert J, Ishaque N, Vardapour R et al (2015) Mutations in the *SIX1/2* Pathway and the *DROSHA/DGCR8* miRNA microprocessor complex underlie high-risk blastemal type Wilms tumors. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.01.002>
- Senanayake U, Das S, Vesely P et al (2012) miR-192, miR-194, miR-215, miR-200c and miR-141 are downregulated and their common target *ACVR2B* is strongly expressed in renal childhood neoplasms. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs126>
- Mahamdallie S, Yost S, Poyastro-Pearson E et al (2019) Identification of new Wilms tumour predisposition genes: an exome sequencing study. *Lancet Child Adolesc Heal* 3. [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(19\)30018-5](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(19)30018-5)
- Hubbard T (2002) The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.38>

32. Sanchez Calle A, Kawamura Y, Yamamoto Y et al (2018) Emerging roles of long non-coding RNA in cancer. *Cancer Sci*
33. Tsagakis I, Douka K, Birds I, Aspden JL (2020) Long non-coding RNAs in development and disease: Conservation to mechanisms. *J Pathol*
34. de Carvalho INSR, de Freitas RM, Vargas FR (2016) Translating microRNAs into biomarkers: What is new for pediatric cancer? *Med Oncol*. <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0766-4>
35. Salomão KB, Pezuk JA, de Souza GR et al (2019) MicroRNA dysregulation interplay with childhood abdominal tumors. *Cancer Metastasis Rev*
36. Bhat AA, Younes SN, Raza SS et al (2020) Role of non-coding RNA networks in leukemia progression, metastasis and drug resistance. *Mol. Cancer*
37. Latowska J, Grabowska A, Zarebska Z et al (2020) Non-coding RNAs in brain tumors, the contribution of lncRNAs, circRNAs, and snoRNAs to cancer development—their diagnostic and therapeutic potential. *Int J Mol Sci* 21:1–31
38. Smith CM, Catchpole D, Hutvagner G (2019) Non-coding RNAs in pediatric solid tumors. *Front. Genet*
39. Quinn JJ, Chang HY (2016) Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet*
40. Zhang X, Wang W, Zhu W et al (2019) Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20225573>
41. Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM (1990) The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 10. <https://doi.org/10.1128/MCB.10.1.28>
42. Brown CJ, Ballabio A, Rupert JL et al (1991) A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*:349. <https://doi.org/10.1038/349038a0>
43. Guttman M, Donaghey J, Carey BW et al (2011) lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477. <https://doi.org/10.1038/nature10398>
44. Lu Z, Carter AC, Chang HY (2017) Mechanistic insights in X-chromosome inactivation. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 372. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0356>
45. Lee S, Kopp F, Chang T-C et al (2016) Noncoding RNA NORAD regulates genomic stability by sequestering PUMILIO proteins. *Cell* 164. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.017>
46. Gomez JA, Wapinski OL, Yang YW et al (2013) The NeST Long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon- $\gamma$  locus. *Cell* 152. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.015>
47. Tsai M-C, Manor O, Wan Y et al (2010) Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 80: 329
48. Prensner JR, Zhao S, Erho N et al (2014) RNA biomarkers associated with metastatic progression in prostate cancer: a multi-institutional high-throughput analysis of SchLAPI. *Lancet Oncol* 15. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71113-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71113-1)
49. Lu Z, Xiao Z, Liu F et al (2016) Long non-coding RNA HULC promotes tumor angiogenesis in liver cancer by up-regulating sphingosine kinase 1 (SPHK1). *Oncotarget* 7. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6280>
50. Esteller M (2011) Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*
51. Watson CN, Belli A, Di Pietro V (2019) Small Non-coding RNAs: new class of biomarkers and potential therapeutic targets in neurodegenerative disease. *Front Genet* 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00364>
52. Mattick JS, Makunin IV (2005) Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet*
53. Kaikkonen MU, Lam MTY, Glass CK (2011) Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res*
54. Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*
55. Mallick B, Ghosh Z (2012) Regulatory RNAs: basics, methods and applications
56. Weick EM, Miska EA (2014) piRNAs: From biogenesis to function. *Dev*
57. Ku HY, Lin H (2014) PIWI proteins and their interactors in piRNA biogenesis, germline development and gene expression. *Natl Sci Rev*
58. Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E et al (2007) A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.026>
59. Russell SJ, LaMarre J (2018) Transposons and the PIWI pathway: Genome defense in gametes and embryos. *Reproduction*
60. Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A et al (2019) PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet*
61. Cheng Y, Wang Q, Jiang W et al (2019) Emerging roles of piRNAs in cancer: challenges and prospects. *Aging (Albany NY)* 11. <https://doi.org/10.18632/aging.102417>
62. Aravin AA, Bourc'his D (2008) Small RNA guides for de novo DNA methylation in mammalian germ cells. *Genes Dev*
63. Wu Q, Ma Q, Shehadeh LA et al (2010) Expression of the Argonaute protein PiwiL2 and piRNAs in adult mouse mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.022>
64. Zhang H, Ren Y, Xu H et al (2013) The expression of stem cell protein Piwi2 and piR-932 in breast cancer. *Surg Oncol* 22. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2013.07.001>
65. Wang D-W, Wang Z-H, Wang L-L et al (2014) Overexpression of Hiwi promotes growth of human breast cancer cells. *Asian Pacific J Cancer Prev* 15. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.18.7553>
66. Bartel DP (2004) MicroRNAs. *Cell* 116. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
67. Elbashir SM (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15. <https://doi.org/10.1101/gad.862301>
68. Zeng Y, Yi R, Cullen BR (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci* 100. <https://doi.org/10.1073/pnas.1630797100>
69. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
70. Bhaskaran M, Mohan M (2014) MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol*. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>
71. Krol J, Loedige I, Filipowicz W (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet*
72. Lee Y, Kim M, Han J et al (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>
73. Lee Y, Ahn C, Han J et al (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
74. Han J, Lee Y, Yeom KH et al (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.043>
75. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>
76. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35053110>

77. Wilson RC, Doudna JA (2013) Molecular Mechanisms of RNA Interference. *Annu Rev Biophys*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130404>
78. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*
79. Kim DH, Sætrom P, Snøve O, Rossi JJ (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808830105>
80. Peng Y, Croce CM (2016) The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduct. Target. Ther*
81. Syeda ZA, Langden SSS, Munkhzul C et al (2020) Regulatory mechanism of microrna expression in cancer. *Int J Mol Sci*
82. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ (2016) OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of MicroRNAs in cancer. *Cancer Res*
83. Lee YS, Dutta A (2009) MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222>
84. Yerukala Sathipati S, Ho SY (2018) Identifying a miRNA signature for predicting the stage of breast cancer. *Sci Rep*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34604-3>
85. Dalmay T, Edwards DR (2006) MicroRNAs and the hallmarks of cancer. *Oncogene*
86. Wang H, Peng R, Wang J et al (2018) Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: The advantage and disadvantage. *Clin. Epigenetics*
87. Pal MK, Jaiswar SP, Dwivedi VN et al (2015) MicroRNA: a new and promising potential biomarker for diagnosis and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Biol Med* 12(4):328–341
88. Tsai MM, Wang CS, Tsai CY et al (2016) Potential diagnostic, prognostic and therapeutic targets of microRNAs in human gastric cancer. *Int. J. Mol. Sci* 17(6):945
89. Wang C, Ding M, Zhu Y-Y et al (2019) Circulating miR-200a is a novel molecular biomarker for early-stage renal cell carcinoma. *ExRNA*. <https://doi.org/10.1186/s41544-019-0023-z>
90. Grobbelaar C, Ford AM (2019) The role of MicroRNA in Paediatric acute lymphoblastic leukaemia: challenges for diagnosis and therapy. *J Oncol*
91. Zeka F, Decock A, Van Goethem A et al (2018) Circulating microRNA biomarkers for metastatic disease in neuroblastoma patients. *JCI insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97021>
92. Ludwig N, Nourkami-Tutdibi N, Backes C et al (2015) Circulating serum miRNAs as potential biomarkers for nephroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. <https://doi.org/10.1002/pbc.25481>
93. Ghasabi M, Mansoori B, Mohammadi A et al (2019) MicroRNAs in cancer drug resistance: Basic evidence and clinical applications. *J Cell Physiol*
94. Si W, Shen J, Zheng H, Fan W (2019) The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clin. Epigenetics*
95. Ma J, Dong C, Ji C (2010) MicroRNA and drug resistance. *Cancer Gene Ther*
96. Galardi A, Colletti M, Businaro P et al (2017) MicroRNAs in neuroblastoma: biomarkers with therapeutic potential. *Curr Med Chem*. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171003120335>
97. Carvalho de Oliveira J, Molinari Roberto G, Baroni M et al (2018) MiRNA dysregulation in childhood hematological cancer. *Int. J. Mol. Sci* 19(9):2688
98. Liu Y, Liu X, Lin C et al (2021) Noncoding RNAs regulate alternative splicing in cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 40. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01798-2>
99. Jiang X, Xing L, Chen Y et al (2021) CircMEG3 inhibits telomerase activity by reducing Cbf5 in human liver cancer stem cells. *Mol Ther - Nucleic Acids* 23. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.11.009>
100. Su M, Xiao Y, Ma J et al (2019) Circular RNAs in Cancer: emerging functions in hallmarks, stemness, resistance and roles as potential biomarkers. *Mol Cancer* 18. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1002-6>
101. Rong Z, Xu J, Shi S et al (2021) Circular RNA in pancreatic cancer: a novel avenue for the roles of diagnosis and treatment. *Theranostics* 11. <https://doi.org/10.7150/thno.56174>
102. Wang L, Yi J, Lu L et al (2021) Estrogen-induced circRNA, circPGR, functions as a ceRNA to promote estrogen receptor-positive breast cancer cell growth by regulating cell cycle-related genes. *Theranostics* 11. <https://doi.org/10.7150/thno.45302>
103. Sukowati CHC, Cabral LKD, Tiribelli C, Pascut D (2021) Circulating long and circular noncoding ma as non-invasive diagnostic tools of hepatocellular carcinoma. *Biomedicines* 9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010090>
104. Beilerli A, Gareev I, Beylerli O et al (2021) Circular RNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Semin Cancer Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.12.026>
105. Wang F, Nazarali AJ, Ji S (2016) Circular RNAs as potential biomarkers for cancer diagnosis and therapy. *Am J Cancer Res* 6:1167–1176
106. Wei G, Zhu J, Hu H-B, Liu J-Q (2021) Circular RNAs: Promising biomarkers for cancer diagnosis and prognosis. *Gene* 771. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145365>
107. Zhang X, Zhang J, Liu Q et al (2020) Circ-CUX1 accelerates the progression of neuroblastoma via miR-16-5p/DMRT2 Axis. *Neurochem Res* 45. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03132-w>
108. Ahmadov U, Bendikas MM, Ebbesen KK et al (2021) Distinct circular RNA expression profiles in pediatric ependymomas. *Brain Pathol*. <https://doi.org/10.1111/bpa.12922>
109. Liu B-H, Zhang B-B, Liu X-Q et al (2018) Expression profiling identifies circular RNA signature in hepatoblastoma. *Cell Physiol Biochem* 45. <https://doi.org/10.1159/000487163>
110. Gaffo E, Boldrin E, Dal Molin A et al (2019) Circular RNA differential expression in blood cell populations and exploration of circRNA deregulation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50864-z>
111. Wu Y, Li Q, Zhang R et al (2021) Circulating microRNAs: Biomarkers of disease. *Clin Chim Acta* 516. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.01.008>
112. Murray MJ, Raby KL, Saini HK et al (2015) Solid tumors of childhood display specific serum microRNA profiles. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0669>
113. Erdmann K, Salomo K, Klimova A et al (2020) Urinary MicroRNAs as potential markers for non-invasive diagnosis of bladder cancer. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21113814>
114. Cochetti G, Cari L, Nocentini G et al (2020) Detection of urinary miRNAs for diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Sci Rep* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77774-9>
115. Marcuello M, Vymetalkova V, Neves RPL et al (2019) Circulating biomarkers for early detection and clinical management of colorectal cancer. *Mol Aspects Med* 69. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.002>
116. Chaniad P, Trakunran K, Geater SL et al (2020) Serum miRNAs associated with tumor-promoting cytokines in non-small cell lung cancer. *PLoS One*:15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241593>
117. Ocadiz-Delgado R, Lizcano-Meneses S, Trejo-Vazquez J et al (2021) Circulating miR-15b, miR-34a and miR-218 as promising novel early low-invasive biomarkers of cervical carcinogenesis. *APMIS* 129. <https://doi.org/10.1111/apm.13093>
118. Abdi E, Latifi-Navid S, Abdi F, Taherian-Esfahani Z (2020) Emerging circulating MiRNAs and LncRNAs in upper gastrointestinal cancers. *Expert Rev Mol Diagn* 20. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1842199>

119. Rzepiel A, Kutzegi N, Gézsi A et al (2019) Circulating microRNAs as minimal residual disease biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Transl Med* 17. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2114-x>
120. López-Aguilar JE, Velázquez-Flores MA, Simón-Martínez LA et al (2017) Circulating microRNAs as biomarkers for pediatric astrocytomas. *Arch Med Res* 48. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.07.002>
121. Charlton J, Pavasovic V, Pritchard-Jones K (2015) Biomarkers to detect Wilms tumors in pediatric patients: Where are we now? *Futur. Oncol* 11(15):2221–2234
122. Chandrasekaran K, Karolina DS, Sepramaniam S et al (2012) Role of microRNAs in kidney homeostasis and disease. *Kidney Int*
123. Ma L, Qu L (2013) The function of MicroRNAs in renal development and pathophysiology. *J. Genet. Genomics*
124. Saal S, Harvey SJ (2009) MicroRNAs and the kidney: coming of age. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18(4):317–323
125. Xue M, Zhou Y, Liu X et al (2016) Proliferation of metanephric mesenchymal cells is inhibited by miR-743a-mediated WT1 suppression in vitro. *Mol Med Rep*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5762>
126. Ho J, Pandey P, Schatton T et al (2011) The pro-apoptotic protein bim is a microRNA target in kidney progenitors. *J Am Soc Nephrol*. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010080841>
127. Sequeira-Lopez MLS, Weatherford ET, Borges GR et al (2010) The MicroRNA-processing enzyme *dicer* maintains juxtaglomerular cells. *J Am Soc Nephrol* 21. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009090964>
128. Zhdanova O, Srivastava S, Di L et al (2011) The inducible deletion of Droscha and microRNAs in mature podocytes results in a collapsing glomerulopathy. *Kidney Int*. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.122>
129. Bartram MP, Dafinger C, Habbig S et al (2015) Loss of Dger8-mediated microRNA expression in the kidney results in hydronephrosis and renal malformation hydronephrosis and renal malformation. *BMC Nephrol*. <https://doi.org/10.1186/s12882-015-0053-1>
130. Trionfini P, Benigni A (2017) MicroRNAs as master regulators of glomerular function in health and disease. *J Am Soc Nephrol*
131. Shi S, Yu L, Chiu C et al (2008) Podocyte-selective deletion of *dicer* induces proteinuria and glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 19. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008030312>
132. Pritchard-Jones K, Hastie ND (1990) Wilms' tumour as a paradigm for the relationship of cancer to development. *Cancer Surv*
133. Hohenstein P, Hastie ND (2014) LINKing microRNAs, kidney development, and Wilms tumors. *Genes Dev*. <https://doi.org/10.1101/gad.242735.114>
134. Hajamis S, Yheskel M, Williams D et al (2018) Suppression of microRNA Activity in Kidney Collecting Ducts Induces Partial Loss of Epithelial Phenotype and Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. <https://doi.org/10.1681/ASN.2017030334>
135. Kruber P, Angay O, Winkler A et al (2019) Loss or oncogenic mutation of DROSHA impairs kidney development and function, but is not sufficient for Wilms tumor formation. *Int J Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.31952>
136. Newman MA, Thomson JM, Hammond SM (2008) Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.1155108>
137. Thornton JE, Gregory RI (2012) How does Lin28 let-7 control development and disease? *Trends Cell Biol* 22(9):474–482
138. Urbach A, Yermalovich A, Zhang J et al (2014) Lin28 sustains early renal progenitors and induces Wilms tumor. *Genes Dev*. <https://doi.org/10.1101/gad.237149.113>
139. Shyh-Chang N, Zhu H, Yvanka De Soysa T et al (2013) XLin28 enhances tissue repair by reprogramming cellular metabolism. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.059>
140. Chang HM, Triboulet R, Thornton JE, Gregory RI (2013) A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28-let-7 pathway. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature12119>
141. Lawlor ER, Thiele CJ (2012) Epigenetic changes in pediatric solid tumors: Promising new targets. *Clin Cancer Res*
142. Roberti A, Valdes AF, Torrecillas R et al (2019) Epigenetics in cancer therapy and nanomedicine. *Clin Epigenetics*
143. Kort EJ, Farber L, Tretiakova M et al (2008) The E2F3-oncomir-1 axis is activated in Wilms' tumor. *Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0592>
144. Drake KM, Ruteshouser EC, Natrajan R et al (2009) Loss of heterozygosity at 2q37 in sporadic Wilms' tumor: Putative role for miR-562. *Clin Cancer Res*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1065>
145. Imam JS, Buddavarapu K, Lee-Chang JS et al (2010) MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/nc.2010.233>
146. Cui M, Liu W, Zhang L et al (2017) Clinicopathological parameters and prognostic relevance of miR-21 and PTEN expression in Wilms' tumor. *J Pediatr Surg*. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.12.005>
147. Cui M, Liu W, Zhang L et al (2017) Over-expression of miR-21 and lower PTEN levels in Wilms' tumor with aggressive behavior. *Tohoku J Exp Med*. <https://doi.org/10.1620/tjem.242.43>
148. Watson JA, Bryan K, Williams R et al (2013) miRNA profiles as a predictor of chemoresponsiveness in Wilms' tumor blastema. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053417>
149. Ludwig N, Werner TV, Backes C et al (2016) Combining miRNA and mRNA expression profiles in Wilms tumor subtypes. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms17040475>
150. Leichter AL, Sullivan MJ, Eccles MR, Chatterjee A (2017) MicroRNA expression patterns and signalling pathways in the development and progression of childhood solid tumours. *Mol. Cancer*
151. Clark PE, Polosukhina D, Love H et al (2011)  $\beta$ -Catenin and K-RAS synergize to form primitive renal epithelial tumors with features of epithelial Wilms' tumors. *Am J Pathol*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.08.006>
152. Yi Y, Polosukhina D, Love HD et al (2015) A murine model of K-RAS and  $\beta$ -catenin induced renal tumors expresses high levels of E2F1 and resembles human Wilms tumor. *J Urol*. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.04.090>
153. Corrigendum to: Functional KRAS mutations and a potential role for PI3K/AKT activation in Wilms tumors (*Molecular Oncology*, (2017), 11, 4, (405 – 421), 10.1002/1878-0261.12044). *Mol. Oncol*
154. Xue X, Liu Y, Wang Y et al (2016) MiR-21 and MiR-155 promote non-small cell lung cancer progression by downregulating *SOCS1*, *SOCS6*, and *PTEN*. *Oncotarget* 7. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13022>
155. Fu X, Wen H, Jing L et al (2017) MicroRNA-155-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by suppressing PTEN through the PI3K/Akt pathway. *Cancer Sci* 108. <https://doi.org/10.1111/cas.13177>
156. G-J ZHANG, H-X XIAO, H-P TIAN et al (2013) Upregulation of microRNA-155 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells through the regulation of claudin-1 expression. *Int J Mol Med* 31. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1348>
157. Luo X, Dong J, He X et al (2020) MiR-155-5p exerts tumor-suppressing functions in Wilms tumor by targeting IGF2 via the PI3K signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 125. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109880>

158. Chuk MK, Widemann BC, Minard CG et al (2018) A phase 1 study of cabozantinib in children and adolescents with recurrent or refractory solid tumors, including CNS tumors: Trial ADVL1211, a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. <https://doi.org/10.1002/pbc.27077>
159. Maschietto M, de Camargo B, Brentani H et al (2008) Molecular profiling of isolated histological components of Wilms tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway in kidney and tumor development. *Oncology*:75. <https://doi.org/10.1159/000155210>
160. Yoo NJ, Kim S, Lee SH (2009) Mutational analysis of WTX gene in Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in gastric, colorectal, and hepatocellular carcinomas. *Dig Dis Sci* 54. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0458-9>
161. Cai J, Fang L, Huang Y et al (2018) Erratum: Publisher Correction: Simultaneous overactivation of Wnt/ $\beta$ -catenin and TGF $\beta$  signalling by miR-128-3p confers chemoresistance-associated metastasis in NSCLC (Nature communications (2017) 8 (15870)). *Nat. Commun*
162. Sha Y-L, Liu S, Yan W-W, Dong B (2019) Wnt/ $\beta$ -catenin signaling as a useful therapeutic target in hepatoblastoma. *Biosci Rep* 39. <https://doi.org/10.1042/BSR20192466>
163. Lei Y, Chen L, Zhang G et al (2020) MicroRNAs target the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway to regulate epithelial-mesenchymal transition in cancer (Review). *Oncol Rep*. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7703>
164. Schedl A (2007) Renal abnormalities and their developmental origin. *Nat Rev Genet* 8. <https://doi.org/10.1038/nrg2205>
165. Pérez-Linares FJ, Pérezpeña-Diazconti M, García-Quintana J et al (2020) MicroRNA profiling in Wilms tumor: identification of potential biomarkers. *Front Pediatr* 8. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00337>
166. Han Y (2019) Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J Transl Med* 17. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1869-4>
167. Lehmann W, Mossmann D, Kleemann J et al (2016) ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types. *Nat Commun* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10498>
168. Wang Y, Xu X, Maglic D et al (2018) Comprehensive molecular characterization of the hippo signaling pathway in cancer. *Cell Rep* 25. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.001>
169. Oostveen RM, Pritchard-Jones K (2019) Pharmacotherapeutic Management of Wilms Tumor: An Update. *Pediatr Drugs*. <https://doi.org/10.1007/s40272-018-0323-z>
170. Xu Q, Xie W (2018) Epigenome in early mammalian development: inheritance, reprogramming and establishment. *Trends Cell Biol*
171. Stewart-Morgan KR, Petryk N, Groth A (2020) Chromatin replication and epigenetic cell memory. *Nat Cell Biol*
172. Ehrlich M, Jiang G, Fiala E et al (2002) Hypomethylation and hypermethylation of DNA in Wilms tumors. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205890>
173. Charlton J, Williams RD, Sebire NJ et al (2015) Comparative methylome analysis identifies new tumour subtypes and biomarkers for transformation of nephrogenic rests into Wilms tumour. *Genome Med*. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0136-4>
174. de Sá Pereira BM, Montalvão-de-Azevedo R, Faria PA et al (2017) Association between long interspersed nuclear element-1 methylation levels and relapse in Wilms tumors. *Clin Epigenetics* 9. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0431-6>
175. da Silva Guerra JV, de Sá Pereira BM, da Cruz JGV et al (2019) Genes controlled by DNA methylation are involved in Wilms tumor progression. *Cells* 8:921
176. Ortiz MV, Ahmed S, Burns M et al (2019) Prohibitin is a prognostic marker and therapeutic target to block chemotherapy resistance in Wilms' tumor. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.127098>
177. Brzezinski J, Choufani S, Romao R, Shuman C, Chen H, Cunanan J, Bagli D, Grant R, Lorenzo A, Weksberg R (2021) Clinically and biologically relevant subgroups of Wilms tumour defined by genomic and epigenomic analyses. *Br J Cancer* 124(2):437–446. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01102-1>
178. Biderman Waberski M, Lindhurst M, Keppler-Noreuil KM et al (2018) Urine cell-free DNA is a biomarker for nephroblastomatosis or Wilms tumor in PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Genet Med*. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.228>
179. Salehi M, Sharifi M (2018) Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *J Cell Physiol*
180. Powers JT, Tzanov KM, Pearson DS et al (2016) Multiple mechanisms disrupt the let-7 microRNA family in neuroblastoma. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature18632>
181. Hameiri-Grossman M, Porat-Klein A, Yaniv I et al (2015) The association between let-7, RAS and HIF-1 $\alpha$  in Ewing Sarcoma tumor growth. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5616>
182. de Vito C, Riggi N, Suvà ML et al (2011) Let-7a is a direct EWS-FLI-1 target implicated in Ewing's Sarcoma development. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023592>
183. Zakrzewska M, Fendler W, Zakrzewski K et al (2016) Altered microRNA expression is associated with tumor grade, molecular background and outcome in childhood infratentorial ependymoma. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158464>
184. Gyugos M, Lendvai G, Kenessey I et al (2014) MicroRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virchows Arch*. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1549-y>
185. Fontana L, Fiori ME, Albini S et al (2008) Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002236>
186. Ye P, Ke X, Zang X et al (2018) Up-regulated MiR-27-3p promotes the G1-S phase transition by targeting inhibitor of growth family member 5 in osteosarcoma. *Biomed Pharmacother*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.066>
187. Liu X, Peng H, Liao W et al (2018) MiR-181a/b induce the growth, invasion, and metastasis of neuroblastoma cells through targeting ABH1. *Mol Carcinog*. <https://doi.org/10.1002/mc.22839>
188. Li L, Wang X, Liu D (2019) MicroRNA-185 inhibits proliferation, migration and invasion in human osteosarcoma MG63 cells by targeting vesicle-associated membrane protein 2. *Gene*. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.01.034>
189. Yang SY, Choi SA, Lee JY et al (2015) miR-192 suppresses leptomeningeal dissemination of medulloblastoma by modulating cell proliferation and anchoring through the regulation of DHFR, integrins, and CD47. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6227>
190. Shang G, Mi Y, Mei Y et al (2018) MicroRNA-192 inhibits the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells and promotes apoptosis by targeting matrix metalloproteinase-11. *Oncol Lett*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8239>
191. Wang Y, Zhang S, Xu Y et al (2016) Upregulation of miR-192 inhibits cell growth and invasion and induces cell apoptosis by targeting TCF7 in human osteosarcoma. *Tumor Biol*. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5417-z>
192. Miao J, Wang W, Wu S et al (2018) MiR-194 Suppresses proliferation and migration and promotes apoptosis of osteosarcoma cells by targeting CDH2. *Cell Physiol Biochem*. <https://doi.org/10.1159/000487973>
193. Berlanga P, Muñoz L, Piqueras M et al (2016) miR-200c and phospho-AKT as prognostic factors and mediators of

- osteosarcoma progression and lung metastasis. *Mol Oncol*. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.04.004>
194. Xie L, Yao Z, Zhang Y et al (2018) Deep RNA sequencing reveals the dynamic regulation of miRNA, lncRNAs, and mRNAs in osteosarcoma tumorigenesis and pulmonary metastasis article. *Cell Death Dis*. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0813-5>
195. Han LL, Zhou XJ, Li FJ et al (2019) MIR-223-3p promotes the growth and invasion of neuroblastoma cell via targeting FOXO1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_201910\\_19298](https://doi.org/10.26355/eurrev_201910_19298)
196. Tang Q, Yuan Q, Li H et al (2018) miR-223/Hsp70/JNK/JUN/miR-223 feedback loop modulates the chemoresistance of osteosarcoma to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.091>
197. Lynch J, Fay J, Meehan M et al (2012) MiRNA-335 suppresses neuroblastoma cell invasiveness by direct targeting of multiple genes from the non-canonical TGF- $\beta$  signalling pathway. *Carcinogenesis*. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs114>
198. Xie Y, Deng H, Wei R et al (2019) Overexpression of miR-335 inhibits the migration and invasion of osteosarcoma by targeting SNIP1. *Int J Biol Macromol*. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.016>
199. Kaid C, Jordan D, de Siqueira Bueno HM et al (2019) miR-367 as a therapeutic target in stem-like cells from embryonal central nervous system tumors. *Mol Oncol*. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12562>
200. Kaid C, Silva PBG, Cortez BA et al (2015) miR-367 promotes proliferation and stem-like traits in medulloblastoma cells. *Cancer Sci*. <https://doi.org/10.1111/cas.12733>
201. Weiss JBW, Wagner AE, Eberherr C et al (2020) High expression of IGF2-derived intronic miR-483 predicts outcome in hepatoblastoma. *Cancer Biomarkers*. <https://doi.org/10.3233/cbm-191390>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Article

# A Metabonomic View on Wilms Tumor by High-Resolution Magic-Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Ljubica Tasic <sup>1,\*</sup>, Nataša Avramović <sup>2</sup>, Melissa Quintero <sup>1</sup>, Danijela Stanisic <sup>1</sup>, Lucas G. Martins <sup>1</sup>, Tassia Brena Barroso Carneiro da Costa <sup>1</sup>, Milka Jadranin <sup>3</sup>, Maria Theresa de Souza Accioly <sup>4</sup>, Paulo Faria <sup>5</sup>, Beatriz de Camargo <sup>6</sup>, Bruna M. de Sá Pereira <sup>6</sup> and Mariana Maschietto <sup>7,†</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Chemical Biology, Institute of Chemistry, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Sao Paulo 13083-970, Brazil; meliquies@gmail.com (M.Q.); dacici.stanisic@gmail.com (D.S.); lgmartins1984@gmail.com (L.G.M.); tassiabrena@gmail.com (T.B.B.C.d.C.)

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Institute of Medical Chemistry, University of Belgrade, Višegradska 26, 11000 Belgrade, Serbia; natasa.avramovic@med.bg.ac.rs

<sup>3</sup> Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy, Department of Chemistry, University of Belgrade, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia; milkaj@chem.bg.ac.rs

<sup>4</sup> National Bank of Tumors of National Cancer Institute (BNT-INCA), Rio de Janeiro 20231-091, Brazil; maccioly@inca.gov.br

<sup>5</sup> Department of Pathology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21941-901, Brazil; paulofaria@gmail.com

<sup>6</sup> Clinical Research Department, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro 20231-091, Brazil; bdecamar@terra.com.br (B.d.C.); pereira.brunams@gmail.com (B.M.d.S.P.)

<sup>7</sup> National Laboratory of Biosciences (LNBio), National Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Sao Paulo 13083-100, Brazil; marianamasc@gmail.com

\* Correspondence: ljubica@unicamp.br

† Current address: Boldrini Children's Hospital, Campinas, Sao Paulo 13083-884, Brazil.



**Citation:** Tasic, L.; Avramović, N.; Quintero, M.; Stanisic, D.; Martins, L.G.; da Costa, T.B.B.C.; Jadranin, M.; de Souza Accioly, M.T.; Faria, P.; de Camargo, B.; et al. A Metabonomic View on Wilms Tumor by High-Resolution Magic-Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Diagnostics* **2022**, *12*, 157. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12010157>

Academic Editor: Luca Morelli

Received: 14 November 2021

Accepted: 1 January 2022

Published: 10 January 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Pediatric cancer NMR-metabonomics might be a powerful tool to discover modified biochemical pathways in tumor development, improve cancer diagnosis, and, consequently, treatment. Wilms tumor (WT) is the most common kidney tumor in young children whose genetic and epigenetic abnormalities lead to cell metabolism alterations, but, so far, investigation of metabolic pathways in WT is scarce. We aimed to explore the high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) metabonomics of WT and normal kidney (NK) samples. For this study, 14 WT and 7 NK tissue samples were obtained from the same patients and analyzed. One-dimensional and two-dimensional HR-MAS NMR spectra were processed, and the one-dimensional NMR data were analyzed using chemometrics. Chemometrics enabled us to elucidate the most significant differences between the tumor and normal tissues and to discover intrinsic metabolite alterations in WT. The metabolic differences in WT tissues were revealed by a validated PLS-DA applied on HR-MAS T<sub>2</sub>-edited <sup>1</sup>H-NMR and were assigned to 16 metabolites, such as lipids, glucose, and branched-chain amino acids (BCAAs), among others. The WT compared to NK samples showed 13 metabolites with increased concentrations and 3 metabolites with decreased concentrations. The relative BCAA concentrations were decreased in the WT while lipids, lactate, and glutamine/glutamate showed increased levels. Sixteen tissue metabolites distinguish the analyzed WT samples and point to altered glycolysis, glutaminolysis, TCA cycle, and lipid and BCAA metabolism in WT. Significant variation in the concentrations of metabolites, such as glutamine/glutamate, lipids, lactate, and BCAAs, was observed in WT and opened up a perspective for their further study and clinical validation.

**Keywords:** Wilms tumor (WT); NMR-metabonomics; metabolic pathways

## 1. Introduction

Metabolomics depicts and fingerprints the final biochemical effects on molecules with molar masses lower than 2 kDa [1–7] by comparing groups, such as healthy and diseased.

One of the greatest advantages of high-resolution magic-angle spinning (HR-MAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is the possibility of analyzing *ex vivo* samples that mimic on-site analysis and, thus, providing clues on changes in concentration and type of metabolites in the given moment. Therefore, metabolomic studies in pediatric cancers might be a powerful tool to investigate specific metabolic alterations in biochemical pathways and may serve as a potential tool to improve cancer diagnosis [1,2]. Wilms tumor (WT) is the most common renal cancer in childhood, corresponding to about 5% of all cases of pediatric cancers diagnosed between 0 and 14 years of age [8,9]. A remarkable characteristic of WT is the relatively low frequency of genetic alterations, with up to 35 genes mutated in approximately 30% of the cases. The most recurrent mutated gene does not exceed the 14% rate [10]. Epigenetic alterations are identified in up to 70% of WT cases, including alterations in the miRNA processing machinery and DNA methylation [10,11]. Although recent studies indicate that genetic and epigenetic abnormalities promote cell metabolism alterations in WT, so far, little is known about the role of specific metabolic pathways in WT development. Feichtinger et al. [12] showed that the histological subtypes of WT have different energy metabolism. Blastemal and epithelial components presents a normal mitochondrial mass, while the stromal subtype reveals a loss of mitochondrial content compared to normal kidney tissue, indicating a deficiency of all oxidative phosphorylation (OXPHOS) enzymes, low porin expression, and citrate synthase activity [12]. Therefore, alterations in glycolytic and lipid metabolism pathways are expected in WT, with a very high conversion of glucose to ATP and lower rates of catabolism of triacylglycerols (TAGs), and fatty acids (FAs) but higher anabolism of phospholipids (PL) [6]. Kidney metabolic alterations were identified as a trigger for cancer in adults, as reported by Linehan et al. [7], who went even further by identifying kidney cancer as a direct metabolic disease. On the other side, NMR-metabonomics in WT are scarce. For example, there are some data on liquid NMR urine metabolomics where samples of WT showed an increase in the concentrations of the nonpolar amino acids alanine, leucine, and isoleucine (Ala, Leu, Ile), and also iso-valerate, 2-hydroxybutyrate, 2-oxoisovalerate, glucose, dimethylamine, and 2-oxoglutarate and a decrease in the concentrations of creatine, creatinine, acetate, and citrate when compared to controls [13]. As far as we are aware, there is no data on intact WT tissues using NMR. Consequently, the aim of our study was to explore the HR-MAS <sup>1</sup>H-NMR metabonomics of WT and normal kidney (cortex—NK) samples taken from the same patients to identify the metabolic pathways and specific metabolites that are altered in WT samples and are potentially related to Wilms tumorigenesis. HR-MAS-based metabonomics, through the identification of WT metabolite hallmarks might provide insights into patterns of responsiveness to treatment and relapse and lead to personalized treatment. Finally, tissue biopsy by NMR may allow us to understand the molecular changes occurring in the tumor in real-time, derived from intratumor heterogeneity and/or therapeutic pressure and may greatly add to the oncological research.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Samples

This study included frozen tissues from eleven WT patients diagnosed and treated with pre-chemotherapy and three treated with upfront surgery. The samples were collected at the time of surgery and stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until NMR analysis at the National Bank of Tumors of INCA (BNT-INCA, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). All samples were reviewed by a single pathologist who confirmed and selected fourteen WT and seven NK tissue samples for experimental analyses. The WT tissue samples were taken from patients diagnosed as cancer clinical stage III (4/14 cases), when the cancer has spread to lymph nodes in the abdomen or pelvis but not to more distant lymph nodes, or as clinical stage II (10/14 cases). The NK samples matched WT samples diagnosed as clinical stage III (2/7 cases) or II (5/7 cases). The WT samples were taken from equal populations of female and male patients (50%), while the NK samples were taken mostly from female patients (5/7 cases). The

Research Ethics Committee from INCA approved this study (CAAE 09981018.3.0000.5274) with informed consent from parents or the children's legal guardians.

### 2.2. Metabonomics by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Fourteen WT and seven NK tissue samples were analyzed by high-resolution magic-angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy.  $^1\text{H}$ -NMR spectra were performed using a Bruker Avance spectrometer (Bruker BioSpin, Germany) operating at 400 MHz and equipped with the double nuclei 4 mm probe for HR-MAS. One-dimensional water-suppressed  $^1\text{H}$ -NMR spectra were recorded with the nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY1D) pulse sequence and 256 repeats, and the  $T_2$ -edited spectra were recorded using the CPMG (Carr–Purcell–Melbourn–Gill) pulse sequence with 128 repetitions. All spectra were performed at a magic-angle spinning frequency of 4 kHz and 298 K while the chemometrics analysis was executed through the open-access platform MetaboAnalyst ([www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca), accessed on 13 November 2021). Information about processing NMR spectra, pre-processing chemometrics data, and metabolites' assignments were previously depicted [14–16].

### 2.3. Statistical Analysis of NMR Data

The matrices were constructed with 21 spectra (14 for the WT group and 7 for the NK group) and 2800 variables for the parts of the aliphatic region of the  $T_2$ -edited  $^1\text{H}$ -NMR spectra,  $\delta$  0.50–4.50, where, according to the subtraction of the mean spectra of WT and NK, most of the differences were observed. Two principal component analyses (PCA) were performed, one using all spectra, to explore the inherent groupings within samples and to identify outliers, and the other with the spectra of the paired samples of WT and NK tissues from the same patients (14 spectra in total, 7 for WT tissues and 7 for NK tissues). All WT data were modeled with the supervised method of partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to find the metabolite differences between the groups. According to the PLS-DA models, variable importance in projection (VIP) scores were estimated to depict the most different chemical shifts among the analyzed samples. Finally, an orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (oPLS-DA) was employed.

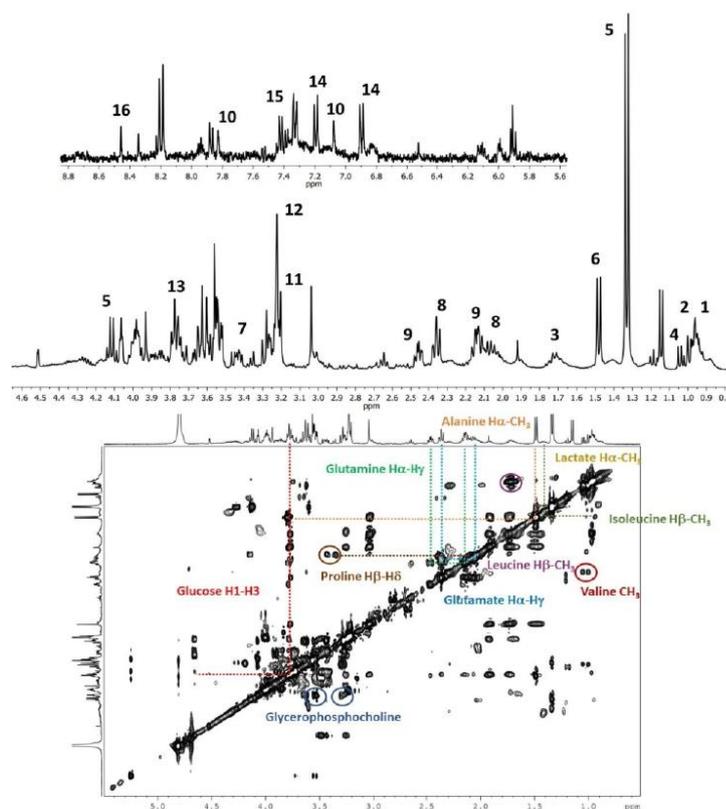
## 3. Results

We evaluated 14 WT and 7 NK tissue samples taken after surgery (3 WT samples) and preoperative chemotherapy (11 WT and 7 NK) by HR-MAS  $^1\text{H}$ -NMR to characterize the intact tissue metabolites and metabolic fingerprints of Wilms tumor. WT is the most frequent kidney cancer. It has a prevalence rate of 8.33 per million children in Brazil [17–21]. Therefore, the investigated cohort of samples is small but significant in terms of the rarity of the disease. It is especially important to emphasize that, at the time of sampling, paired WT and NK underwent the same treatment with pre-chemotherapy.

Two types of 1D NMR experiments by HR-MAS were performed to snapshot tissues. Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY1D) was performed to measure all hydrogen species in the samples, which were then edited with a  $T_2$ -filter (CPMG), where low-molecular-mass metabolites were studied and the signals from macromolecules were attenuated.

An inspection of the data revealed the most significant spectral differences among tissue samples (WT and NK), revealing that  $T_2$ -edited aliphatic and aromatic regions were the ones with the greatest metabolic variations in cancer tissue (Figure 1). Further, the observed differences were confirmed by the chemometrics analysis results (Figures 2 and 3 and Supplementary Material Figure S1).

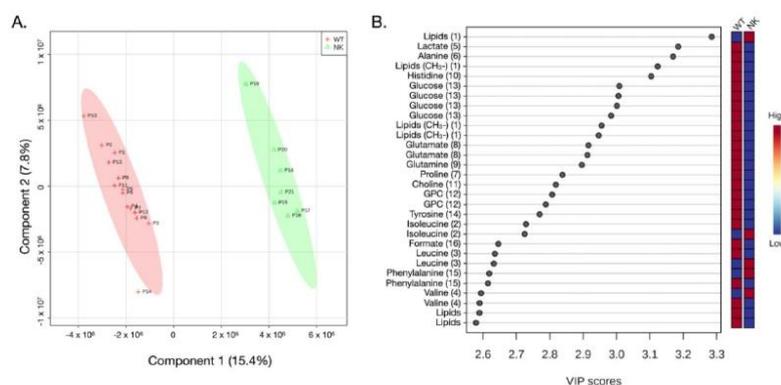
The WT samples were similar metabolically among different patients and showed a similar heterogeneity to NK samples, as could be seen in chemometrics results shown in Figures 2, 3 and S2 (Supplementary Material).



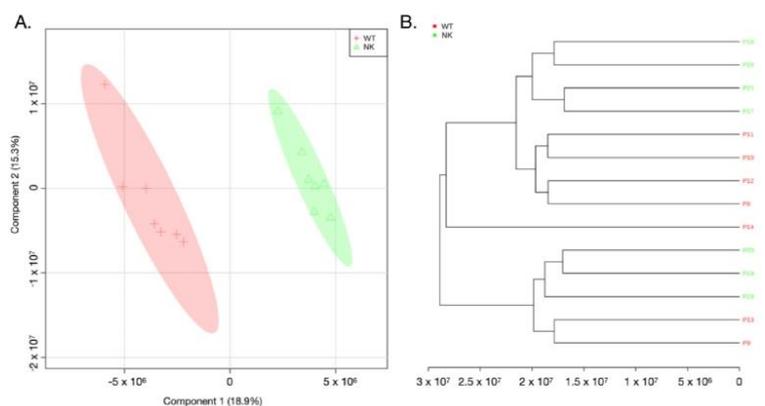
**Figure 1.**  $^1\text{H}$ -NMR HR-MAS spectrum of WT tissue sample acquired using a CPMG (*cpmgpr1d*) pulse sequence; two regions are presented in the lower panel at 0.50 and 4.70 ppm, and, in the upper panel, the region between 5.0 and 9.00 ppm is amplified 20 times. Sixteen metabolites were identified: fatty acids ( $\text{CH}_3$ -) (1), isoleucine (2), leucine (3), valine (4), lactate (5), alanine (6), proline (7), glutamate (8), glutamine (9), histidine (10), choline (11), glycerophosphocholine (12), glucose (13), tyrosine (14), phenylalanine (15), and formate (16). At the bottom the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY spectrum is shown (aliphatic region, 0.00–5.50 ppm) with marked correlations.

The partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) results are shown in Figures 2 and 3, for 21 and 14 analyzed samples, respectively. It is worth saying that the cluster analysis presented in Figure 3B and in the heatmap (Figure 4B) also show the separation of groups without the misclassification of the samples WT or NK. Furthermore, WT samples appeared to be more similar among each other than to NK, independent of the fact that the NK and WT tissues were taken from the same individual.

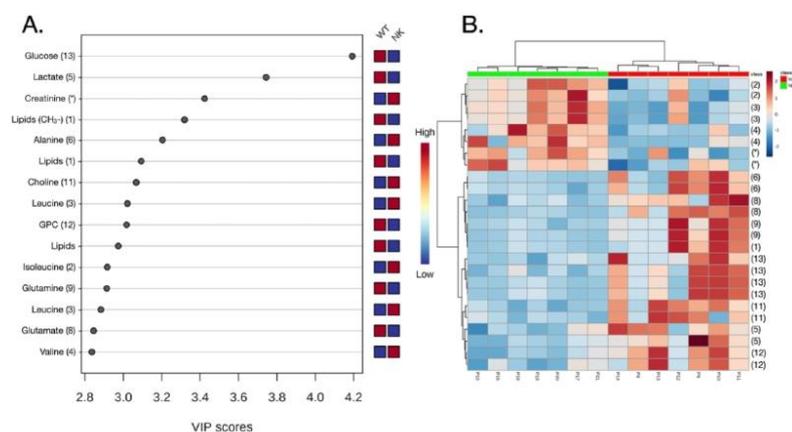
The metabolites that distinguished WT from NK samples were revealed by validated PLS-DA (Accuracy: 0.877,  $R^2$ : 0.690, and  $Q^2$ : 0.577), and among them, sixteen metabolites (Figures 1 and 2B) showed the highest contributions to group separation, with variable importance in projection (VIP) values higher than 2.5. Using the 1D and 2D NMR data (TOCSY), those were assigned to lipids, glucose, aliphatic branched-chain amino acids (BCAAs), and other metabolites (Figures 1 and 2B). It is worth stating that the oPLS-DA model for the same datasets is illustrated in the Supplementary Material (Figure S1).



**Figure 2.** (A) PLS-DA score plot in 2D of the HR-MAS <sup>1</sup>H-NMR CPMG data, showing 21 tissue samples, 14 WT and 7 NK. The WT tissue samples are shown with the red crosses and the normal kidney (NK) tissue samples are shown with green triangles. Accuracy: 0.877, R<sup>2</sup>: 0.690, and Q<sup>2</sup>: 0.577. (B). Variable importance in projection (VIP) scores greater than 2.5 show the important metabolites (1–16 as illustrated in Figure 1) that are discriminatory for WT vs. NK in the PLS-DA model.



**Figure 3.** (A) PLS-DA score plot in 2D of the HR-MAS <sup>1</sup>H-NMR CPMG data, showing 14 paired tissue samples, 7 WT and 7 NK. The WT tissue samples are shown with red crosses and the normal kidney (NK) tissue samples are shown with green triangles. Accuracy: 0.774, R<sup>2</sup>: 0.902, and Q<sup>2</sup>: 0.430. The VIP scores greater than 2.7 corresponded to metabolites from the aliphatic region (0.50 to 4.50 ppm, metabolites 1–9 and 11–13, see Figures 1 and 4). (B) Hierarchical Cluster Analysis (HCA) shows a graphical representation of the PCA scores for component 1 (describing 17.1% of the total variance) plotted against component 2 (13% of the total variance) and shows the similarities or differences among the tissue samples, wherein the samples that form clusters show similarities, and samples that are found at greater distances are dissimilar. The WT P14 is a unique sample with incidence of metastasis. NK samples P18 and P19 were from the patients with WT clinical stage III. Similarities were observed among the WT samples and among the WT and NK samples from the same individuals.



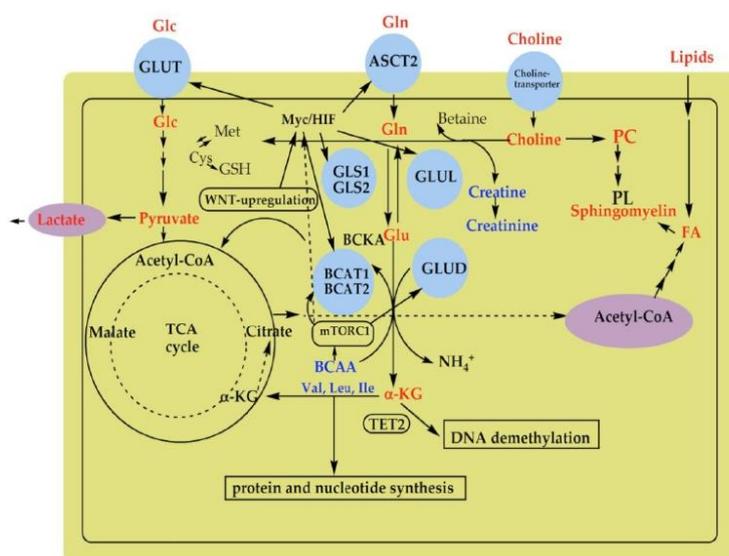
**Figure 4.** (A) Variable Importance in Projection (VIP) scores greater than 2.7 obtained in the  $^1\text{H-NMR}$  CPMG HRMAS model by PLS-DA. The most significant concentration variations were observed for lipids, lactate, and glucose, as could be seen for the model when the seven WT and seven NK paired samples were analyzed. The numbers given in brackets correspond to the metabolites' assignments shown in Figure 1. (B) Cluster analysis presented as a heatmap. The WT samples are shown in red, and the numbers in brackets correspond to the metabolites' assignments shown in Figure 1.

There are differences in metabolites' concentrations in WT compared to the NK tissue samples (Figure 2B and Supplementary Materials Figure S2), from which 13 metabolites showed increased and 3 decreased concentrations in the WT samples. The concentrations of the BCAAs, including valine, leucine, and isoleucine were decreased in WT tissue samples compared to controls. However, WT samples showed higher levels of lipids, lactate, and glutamine/glutamate versus controls, as illustrated in Figures 2B and 4.

#### 4. Discussion

The metabolite concentrations that differ in WT and NK tissue samples may point to altered metabolic pathways and may be potential diagnostic candidates. WT tissues showed altered metabolic pathways that involve the TCA cycle, lipids, glycolysis, glutaminolysis, and branched-chain amino acid (BCAA) metabolism when compared to NK samples [22,23].

Cancer cells have an enhanced requirement for glucose as a nutrient, and instead of converting it through pyruvate to acetyl-CoA via the TCA cycle of energy production, glucose is mainly converted to lactate by glycolysis [23,24]. A higher level of lactate was identified in the investigated WT tissue samples, demonstrating altered glycolysis. Tumor cells present a highly activated glycolytic pathway in the presence of oxygen (Warburg effect) that contributes to cell proliferation [24]. Tumor cells consume glutamine at unusually high rates, and its metabolism, called glutaminolysis [24], is involved in the neoplastic transformation, since its inhibition decreases cell proliferation [25]. WT samples presented an increased concentration of glutamine and glutamate supporting enhanced glutaminolysis. The conversion of glutamine to glutamate by glutaminase (GLS1 or GLS2), which is further transformed to  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG) by glutamate dehydrogenase (GLUD1 or GLUD2) or aminotransferases, promotes the TCA metabolism that contributes to sustaining the energy used for cancer cell proliferation [25–27]. The TCA cycle also promotes lipid synthesis through the conversion of  $\alpha$ -KG in citrate by reductive carboxylation. The increased concentrations of lipids in WT tissue samples demonstrated increased lipid demand in cancer cells due to the requirement for the synthesis of cell membranes whose components are phospholipids (PL) (Figure 5) [28].



**Figure 5.** Illustration of the main metabolic pathways that are reported to be altered in WT. Metabolites with altered concentrations in WT tissues included glucose (Glc), glutamine (Gln), glutamate (Glu),  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ -KG), phosphatidylcholine (PC), phospholipids (PL), branched-chain amino acids ( BCAAs, such as valine (Val), leucine (Leu), isoleucine (Ile)), as well as, cysteine (Cys), methionine (Met), and glutathione (GSH). Metabolic pathways in WT are altered by oncogenes and tumor suppressor genes such as *MYC*, hypoxia-inducible factors (*HIF*), transforming growth factor- $\beta$  (*TGF $\beta$ )-WNT, and complex 1 of the mammalian target of rapamycin (mTORC1) signaling pathways promoting upregulation of many metabolic enzymes including glutaminase (GLS1 and GLS2), glutamine synthetase (GLUL), glutamate dehydrogenase (GLUD), branched-chain aminotransferase (BCAT1 and BCAT2), ten-eleven translocation 2 DNA demethylase (TET2), and transporters such as transporter of glucose (GLUT) and glutamine (ASCT2).*

Main cell membrane PL is sphingomyelin including choline in its content. Recently MacLellan et al. reported decreased concentrations of urinary creatine and creatinine in patients with WT [13]. Creatinine is a choline precursor, supporting the fact that with increasing lipid demand in cancer tissues, urinary lipid concentration decreases, leading to a reduction in urinary choline and, consequently, in creatine and creatinine in WT patients, similar to other cancers [24,28].

In contrast to the increase in concentrations of lactate, glutamine/glutamate, and lipids, concentrations of three BCAAs decreased in WT samples compared to controls. Indeed, BCAAs are essential amino acids taken up through the diet due to the impossibility of synthesis by human cells [29]. Glutamate is a co-product in the first step of BCAA catabolism with the conversion of BCAAs to branched-chain keto acids (BCKA) by branched-chain aminotransferase (BCAT1 in cytosol or BCAT2 in mitochondria). BCAA-originated glutamate is a source of the nitrogen used for the synthesis of macromolecules such as nucleotides and the proteins necessary for cancer cell growth (Figure 5) [24,30–32]. Altered BCAA metabolism has an important role in cancer progression and the crucial enzymes in the BCAA metabolic pathway might be possible prognostic and diagnostic biomarkers in human cancers. Our study also supports the finding that BCAAs in WT tissue can play a role as a diagnostic cancer biomarker. On the other hand, MacLellan et al. showed increased concentrations of urinary BCAAs in WT patients [13]. The contrasting results may be a consequence of the different treatments the patients were subjected to.

Most samples from our study came from patients that underwent chemotherapy. Enhanced intracellular  $\alpha$ -KG levels in WT by promoted glutaminolysis also increases the activity of another  $\alpha$ -KG-dependent dioxygenase, such as the ten-eleven translocation 2 (TET2) DNA demethylase and leads to DNA hypomethylation [23,33]. This finding is in agreement with the recently reported data by Guerra et al. which demonstrated a hypomethylation profile in WT compared to NK through global gene expression and methylation analyses [17]. These findings suggest that metabolic pathways in WT are altered by diverse oncogenes and tumor suppressor genes such as MYC, HIF, TGF $\beta$ , WNT, and mTOR signaling pathways promoting the upregulation of many metabolic enzymes and transporters (Figure 5). In this way, transporters of glucose (GLUT) and glutamine (ASCT2) and metabolic enzymes, including glutaminase (GLS1 and GLS2), glutamate dehydrogenase (GLUD1 or GLUD2), and branched-chain aminotransferase (BCAT1 and BCAT2), might have an important role in the diagnosis and treatment of WT and could be attractive targets for further exploration and research.

A limitation of this study is that the samples used had received preoperative chemotherapy, according to the SIOP protocol [34–36]. Thus, we cannot exclude the possibility that at least part of the changes in metabolites levels was induced by the treatment. Moreover, the number of cases prevents us from comparing WT subgroups, such as histological subtypes and clinical stages. Another limitation is that we cannot directly compare our findings with previous studies that evaluated metabolites in patients with WT as the sources used are different (tissue vs. urine), preventing some validation of our findings.

## 5. Conclusions

In our study, we summarize that altered glycolysis, glutaminolysis, TCA cycle, lipid metabolism, and BCAA metabolism in WT tissue by alterations of the concentrations of several metabolites such as glutamine/glutamate, lipids, lactate, and BCAAs, which might be considered as potential diagnostic WT biomarkers. Metabolite levels in WT tissue are changed due to the requirement of cancer cells for nutrients and the building blocks to survive and proliferate, activating diverse signaling pathways and oncogenes, which modify metabolic pathways through the upregulation of metabolic enzymes. Considering the important role of glycolysis, glutaminolysis, and BCAA metabolic reprogramming in WT, the metabolites, and their related metabolic pathways might be involved with Wilms tumorigenesis and deserve to be explored in prospective studies. The identified differences among the metabolites in WT tissues may lead, not just to the identification of WT biomarkers with the potential for early cancer diagnostic and prognostic purposes, but also to a tailor-made treatment.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/diagnostics12010157/s1>, Figure S1: oPLS-DA scores plots in 2D, T score vs. Orthogonal T score, of the HR-MAS <sup>1</sup>H-NMR CPMG spectra models: (A) constructed using 21 tissue samples, 14 WT and 7 NK (Permutation analysis R<sup>2</sup>Y: 0.878 for  $p < 0.05$ , and Q<sup>2</sup>: 0.620 for  $p < 0.05$ ); (B) constructed for 7 paired WT and NK samples (Permutation analysis R<sup>2</sup>Y: 0.787 for  $p < 0.05$ , and Q<sup>2</sup>: 0.677 for  $p < 0.05$ ). WT tissue samples are shown in the red crosses and normal kidney (NK) tissue samples are shown in green triangles. Figure S2: Box plots of Lipids (0.803 ppm), Lactate (1.33 ppm), and Glucose (metabolite 13, see Figure 1) variation according to t-test univariate analysis in paired cancer tissue samples, 7WT vs. 7 NK; WT tissue samples are shown in the red and normal kidney (NK) tissue samples are shown in green (upper panel). Superposition of <sup>1</sup>H-NMR (CPMG HRMAS) of WT (red) and NK samples, shown in the lower panel. Just 0.50–4.50 ppm regions were used for PLS-DA and oPLS-DA models.

**Author Contributions:** L.T.: conceptualization, methodology, investigation, writing—original draft preparation, review, and editing; N.A.: data investigation, writing—original draft preparation, review, and editing; M.Q.: formal analysis and editing; D.S.: formal analysis and editing; L.G.M.: formal analysis, review, and editing; T.B.B.C.d.C.: formal analysis and editing; M.J.: formal analysis and editing; P.F.: a pathological review of cases; M.T.d.S.A.: sample handling; B.d.C.: formal clinical analysis, sample curation, and editing; B.M.d.S.P.: sample curation, writing—original draft preparation, review, and editing; M.M.: investigation, writing—original draft preparation, review, and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP), grants numbers #2018/24069-3, #2018/06510-4, and #2014/10250-7. M.J. was funded by the International Cooperation Branch, Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW), Hague, The Netherlands, grant number L/ICA/ICB/221146/19. We kindly acknowledge INCTBio (CNPq 465389/2014-7 and FAPESP #2014/50867-3) for financial support.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was approved by the Research Ethics Committee from the National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil (CAAE 09981018.3.0000.5274) with informed consent from parents or the children's legal guardians.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from the parents or the children's legal guardians for all individuals involved in the study. Written informed consent has been obtained to publish this article.

**Data Availability Statement:** The authors confirm that the data supporting the findings are included in the article and the set of raw data that support the reported findings is available from the corresponding author upon request.

**Acknowledgments:** On this occasion, we would like to thank the funding agencies, especially *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP), Grants #2018/24069-3, #2018/06510-4, and #2014/10250-7. NMR experiments were carried out in the Institute of Chemistry, NMR Spectroscopy Open Facility Laboratory, State University of Campinas. We kindly acknowledge the National Cancer Institute (INCA) and National Bank of Tumor staff involved in tissue collection and storage. Last but not least, we are very grateful to the children, and their parents and caretakers for taking part in this important study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Griffin, J.L.; Shockcor, J.P. Metabolic profiles of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 551–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Beger, R.D. A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites* **2013**, *3*, 552–574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tilgner, M.; Vater, T.S.; Habbel, P.; Cheng, L.L. High-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR methods in metabolomics. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *2037*, 49–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Imperiale, A.; Elbayed, K.; Moussallieh, F.M.; Neuville, A.; Piotto, M.; Bellocq, J.P.; Lutz, P.; Namer, I.J. Metabolomic pattern of childhood neuroblastoma obtained by <sup>1</sup>H-high-resolution magic angle spinning (HRMAS) NMR spectroscopy. *Pediatr. Blood Cancer* **2011**, *56*, 24–34. [[CrossRef](#)]
5. Grinde, M.T.; Giskeodegård, G.F.; Andreassen, T.; Tessem, M.B.; Bathen, T.F.; Moestue, S.A. Biomarker discovery using NMR-based metabolomics of tissue. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *2037*, 243–262. [[CrossRef](#)]
6. Aminzadeh, S.; Vidali, S.; Sperl, W.; Kofler, B.; Feichtinger, R.G. Energy metabolism in neuroblastoma and Wilms tumor. *Transl. Pediatr.* **2015**, *4*, 20–32. [[CrossRef](#)]
7. Linehan, W.; Srinivasan, R.; Schmid, L. The genetic basis of kidney cancer: A metabolic disease. *Nat. Rev. Urol.* **2010**, *7*, 277–285. [[CrossRef](#)]
8. Stiller, C.; Parkin, D. International variations in the incidence of childhood renal tumours. *Br. J. Cancer* **1990**, *62*, 1026–1030. [[CrossRef](#)]
9. Nakata, K.; Colombet, M.; Stiller, C.A.; Pritchard-Jones, K.; Steliarova-Foucher, E.; IICC-3 Contributors. Incidence of childhood renal tumours: An international population-based study. *Int. J. Cancer* **2020**, *147*, 3313–3327. [[CrossRef](#)]
10. Gadd, S.; Huff, V.; Walz, A.L.; Ooms, A.H.A.G.; Armstrong, A.E.; Gerhard, D.S.; Smith, M.A.; Auvil, J.M.G.; Meerzaman, D.; Chen, Q.R.; et al. A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nat. Genet.* **2017**, *49*, 1487–1494. [[CrossRef](#)]
11. Scott, R.H.; Murray, A.; Baskcomb, L.; Turnbull, C.; Loveday, C.; Al-Saadi, R.; Williams, R.; Breatnach, F.; Gerrard, M.; Hale, J.; et al. Stratification of Wilms tumor by genetic and epigenetic analysis. *Oncotarget* **2012**, *3*, 327–335. [[CrossRef](#)]

12. Feichtinger, R.G.; Weis, S.; Mayr, J.A.; Zimmermann, F.; Geilberger, R.; Sperl, W.; Kofler, B. Alterations of oxidative phosphorylation complexes in astrocytomas. *Glia* **2014**, *62*, 514–525. [[CrossRef](#)]
13. MacLellan, D.; Karakach, T.; Naranjo, A.; Fernandez, C.V. Urinary metabolite profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy to distinguish control patients from Wilms tumor (WT) and WT tumor by stage. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, e21013. [[CrossRef](#)]
14. Ulrich, E.L.; Akutsu, H.; Doreleijers, J.F.; Harano, Y.; Ioannidis, Y.E.; Lin, J.; Livny, M.; Mading, S.; Maziuk, D.; Miller, Z.; et al. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *36*, D402–D408. [[CrossRef](#)]
15. Wishart, D.S.; Knox, C.; Guo, A.C.; Eisner, R.; Young, N.; Gautam, B.; Hau, D.D.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bouatra, S.; et al. HMDB: A knowledge base for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D603–D610. [[CrossRef](#)]
16. Xia, J.; Wishart, D.S. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr. Protoc. Bioinform.* **2016**, *55*, 14.10.1–14.10.91. [[CrossRef](#)]
17. Guerra, J.V.D.S.; Pereira, B.M.S.; Cruz, J.G.V.D.; Scherer, N.M.; Furtado, C.; Montalvão de Azevedo, R.; Oliveira, P.S.L.; Faria, P.; Boroni, M.; de Camargo, B.; et al. Genes controlled by DNA methylation are involved in Wilms Tumor progression. *Cells* **2019**, *8*, 921. [[CrossRef](#)]
18. de Camargo, B.; de Oliveira Ferreira, J.M.; de Souza Reis, R.; Ferman, S.; de Oliveira Santos, M.; Pombo-de-Oliveira, M.S. Socioeconomic status and the incidence of non-central nervous system childhood embryonic tumours in Brazil. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 160. [[CrossRef](#)]
19. Parkin, D.M.; Stiller, C.A.; Draper, G.J.; Bieber, C.A. The international incidence of childhood cancer. *Int. J. Cancer* **1988**, *42*, 511–520. [[CrossRef](#)]
20. Dome, J.S.; Graf, N.; Geller, J.I.; Fernandez, C.V.; Mullen, E.A.; Spreafico, F.; Van Den Heuvel-Eibrink, M.; Pritchard-Jones, K. Advances in Wilms tumor treatment and biology: Progress through international collaboration. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 2999–3007. [[CrossRef](#)]
21. Godzinski, J. The current status of treatment of Wilms tumor as per the SIOP trials. *J. Indian Assoc. Pediatr. Surg.* **2014**, *20*, 16. [[CrossRef](#)]
22. Quintero Escobar, M.; Maschietto, M.; Krepischi, A.C.V.; Avramovic, N.; Tasic, L. Insights into the chemical biology of childhood embryonal solid tumors by NMR-based metabolomics. *Biomolecules* **2019**, *9*, 843. [[CrossRef](#)]
23. Altman, B.J.; Stine, Z.E.; Dang, C.V. From Krebs to clinic: Glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 619–634. [[CrossRef](#)]
24. Wang, Z.; Lin, Y.; Liang, J.; Huang, Y.; Ma, C.; Liu, X.; Yang, J. NMR-based metabolomic techniques identify potential urinary biomarkers for early colorectal cancer detection. *Oncotarget* **2017**, *8*, 105819–105831. [[CrossRef](#)]
25. Dias, M.M.; Adamoski, D.; Dos Reis, L.M.; Ascensão, C.F.; de Oliveira, K.R.; Mafra, A.C.P.; da Silva Bastos, A.C.; Quintero, M.; Cassago, C.D.G.; Ferreira, I.M.; et al. GLS2 is protumorigenic in breast cancers. *Oncogene* **2020**, *39*, 690–702. [[CrossRef](#)]
26. Curthoys, N.P.; Watford, M. Regulation of glutaminase activity and glutamine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **1995**, *15*, 133–159. [[CrossRef](#)]
27. Wise, D.R.; Thompson, C.B. Glutamine addiction: A new therapeutic target in cancer. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 427–433. [[CrossRef](#)]
28. Glunde, K.; Penet, M.F.; Jiang, L.; Jacobs, M.A.; Bhujwalla, Z.M. Choline metabolism-based molecular diagnosis of cancer: An update. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2015**, *15*, 735–747. [[CrossRef](#)]
29. Ananieva, E.A.; Wilkinson, A.C. Branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2018**, *21*, 64–70. [[CrossRef](#)]
30. Carrola, J.; Rocha, C.M.; Barros, A.S.; Gil, A.M.; Goodfellow, B.J.; Carreira, I.M.; Bernardo, J.; Gomes, A.; Sousa, V.; Carvalho, L.; et al. Metabolic signatures of lung cancer in biofluids: NMR-based metabolomics of urine. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 221–230. [[CrossRef](#)]
31. Bezabeh, T.; Somorjai, R.; Dolenko, B.; Bryskina, N.; Levin, B.; Bernstein, C.N.; Jeyarajah, E.; Steinhart, A.H.; Rubin, D.T.; Smith, I.C. Detecting colorectal cancer by <sup>1</sup>H magnetic resonance spectroscopy of fecal extracts. *NMR Biomed.* **2009**, *22*, 593–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lin, Y.; Ma, C.; Liu, C.; Wang, Z.; Yang, J.; Liu, X.; Shen, Z.; Wu, R. NMR-based fecal metabolomics fingerprinting as predictors of earlier diagnosis in patients with colorectal cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 29454–29464. [[CrossRef](#)]
33. Peng, H.; Wang, Y.; Luo, W. Multifaceted role of branched-chain amino acid metabolism in cancer. *Oncogene* **2020**, *39*, 6747–6756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Vujančić, G.M.; Gessler, M.; Ooms, A.H.A.G.; Collini, P.; Coulomb-l’Hermine, A.; D’Hooghe, E.; de Krijger, R.R.; Perotti, D.; Pritchard-Jones, K.; Vokuhl, C. The UMBRELLA SIOP-RTSG 2016 Wilms tumour pathology and molecular biology protocol. *Nat. Rev. Urol.* **2018**, *15*, 693–701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Vujančić, G.M.; Sandstedt, B.; Harms, D.; Kelsey, A.; Leuschner, I.; de Kraker, J.; SIOP Nephroblastoma Scientific Committee. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med. Pediatr. Oncol.* **2002**, *38*, 79–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Van den Heuvel-Eibrink, M.M.; van Tinteren, H.; Bergeron, C.; Coulomb-L’Hermine, A.; de Camargo, B.; Leuschner, I.; Sandstedt, B.; Acha, T.; Godzinski, J.; Oldenburger, F. Outcome of localised blastemal-type Wilms tumour patients treated according to intensified treatment in the SIOP WT 2001 protocol, a report of the SIOP Renal Tumour Study Group (SIOP-RTSG). *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 498–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

