



**COMBATENDO E VENCENDO
O CÂNCER INFANTIL**

PRONON

**Sequenciamento de nova geração (NGS) e PCR digital
(ddPCR): a medicina de precisão no diagnóstico,
determinação do prognóstico e na orientação terapêutica de
tumores da infância e adolescência**

2018

A. INFORMAÇÕES DA INSTITUIÇÃO

<u>Programa:</u> PRONON		<u>Portaria de Credenciamento:</u> nº 779 de 30/09/2013	
Razão Social: Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer – GRAACC			
CNPJ: 67.185.694/0001-50			
Endereço: Rua Botucatu, 743			
Bairro: Vila Clementino		Município: São Paulo	UF: SP
CEP: 04023062		Fone: (11) 5904-7283	Fax: (11) 5908-9114
Email: graacc@graacc.org.br / alcionemarques@graacc.org.br		CNES: 2089696	
Dirigente: Sérgio Antônio Garcia Amoroso			
Procurador (se aplicável): Tammy Rodrigues Allersdorfer			

A.1. APRESENTAÇÃO DA INSTITUIÇÃO

O GRAACC - Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer - é uma instituição sem fins lucrativos, criada em 1991 para garantir a crianças e adolescentes com câncer, dentro do mais avançado padrão científico, o direito de alcançar todas as chances de cura com qualidade de vida. O GRAACC é responsável pela administração do Instituto de Oncologia Pediátrica (IOP), que realiza cerca de 3.000 atendimentos anualmente, entre sessões de quimioterapia, consultas, procedimentos ambulatoriais, cirurgias, transplantes de medula óssea e outros. Além de diagnosticar e tratar o câncer infantil, o GRAACC atua no desenvolvimento do ensino e pesquisa em convênio com a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM).

O GRAACC é reconhecido pelo Ministério da Saúde como uma Unidade de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (Unacon). Além disso, já recebeu, entre diversos outros prêmios, o Prêmio Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica -

Tumores Ósseos (USA 2009), o Prêmio Rhomes Aur no XI Congresso de Oncologia Pediátrica (Brasil - 2008, 2010 e 2012), o Prêmio International Society for Pediatric Neurosurgery (Inglaterra - 2007) e o Prêmio Saúde, da Revista Saúde (Brasil - 2006, 2010, 2011). Esse grau de excelência está disponível para toda a população, uma vez que o GRAACC atende famílias de todas as regiões do país, e em 2012, 89% das crianças e adolescentes atendidas pelo GRAACC foram encaminhadas pelo SUS.

B. DO PROJETO

B.1. INFORMAÇÕES GERAIS DO PROJETO

1.1. Título do Projeto: Sequenciamento de nova geração (NGS) e PCR digital (ddPCR): a medicina de precisão no diagnóstico, determinação do prognóstico e na orientação terapêutica de tumores da infância e adolescência

1.2. Pesquisador Principal: Silvia Regina Caminada de Toledo

1.3. Equipe: Indhira Dias Oliveira – pesquisadora associada

Bruna Mascaro Cordeiro - pesquisadora

Francine Tesser Gamba – pesquisadora

B.1.1. Valor total do Projeto: R\$ 4.982.356,21

Material de consumo: R\$ 2.643.697,73 (53,06%)

Equipamentos: R\$ 2.105.101,68 (42,21%)

Recursos Humanos: R\$235.622,80 (4,73%)

B.1.2 Período de execução. 36 meses

B.2. DA(S) AÇÃO(ÕES) E SERVIÇO(S) DE REABILITAÇÃO

De acordo com os artigos 5º e 9º da Portaria 1.550, de 29 de julho de 2014, o campo de atuação pretendido é: Realização de pesquisas clínicas, epidemiológicas e experimentais

B.3. ÁREA(S) PRIORITÁRIA(S) DO PRONON (De acordo com o artigo 6º)

Considerando as opções citadas no artigo 6º da Portaria 1.550, de 29 de julho de 2014, esse projeto trata da área prioritária

V - realização de pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos custo-efetivos para diagnóstico e terapêutica em câncer;

VII - realização de pesquisa e desenvolvimento de inovações, tecnologias e/ou produtos para prevenção, diagnóstico e/ou tratamento de câncer;

PREAMBULO

O conhecimento biológico que obrigatoriamente envolve o empenho de diversas áreas de abordagem aos pacientes, como oncohematologia, cirurgia oncológica, enfermagem, patologia, pesquisa laboratorial e clínica, epidemiologia e estatística, permite o aumento de possibilidades de cura através da medicina individualizada. Esse conceito tem sido cada vez mais valorizado, no estudo do câncer, principalmente no câncer da infância e adolescência, pois tem por objetivo garantir um tratamento cada vez mais específico, com menos efeitos colaterais, diminuição de efeitos tardios, com maior chance de cura e qualidade de vida.

Esse modelo de organização, com objetivos comuns, permite desenvolver protocolos de investigação permeados por cada uma das áreas, abrindo um horizonte onde podemos vislumbrar, em médio prazo, a possibilidade de atuar, modificando e contribuindo para o diagnóstico, a determinação prognóstica e a orientação terapêutica, cada dia mais precisos.

O estabelecimento dos bancos de tumores, a semelhança dos grupos de tratamento europeus e americanos, tornou-se uma necessidade imprescindível para melhorar as taxas de sobrevivência dos pacientes. No momento não existe no Brasil nenhuma outra instituição com uma coleção de amostras de neoplasias da infância como a arquivada e utilizada em projetos de pesquisa do Instituto de Oncologia Pediátrica-GRAACC/UNIFESP (IOP-GRAACC/UNIFESP). A existência de um BIOBANCO institucional, garante a segurança na padronização de novas metodologias além de criar a possibilidade de validação de resultados.

A descoberta de que o DNA tumoral pode ser encontrado no sangue, na urina, no plasma e em outros fluidos corpóreos, permite um novo tipo de biópsia denominada de “biópsia líquida” e abriu um caminho novo no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com câncer. As metodologias que permitem o acesso a essas moléculas ainda são pouco exploradas em câncer da infância e adolescência.

As estratégias utilizando o Sequenciamento de nova geração (NGS) e PCR digital (ddPCR), para análise de moléculas obtidas de amostra tumoral, podem determinar o manejo clínico, aumentando a sensibilidade no diagnóstico e na determinação do prognóstico, além de facilitar a identificação de potenciais regimes terapêuticos, incluindo terapias alvo e imunoterapia. Essa é uma estratégia que tem sido utilizada em neoplasias de adulto onde nos últimos anos tem-se observado um crescente

investimento no desenvolvimento de terapias alvo. Para as neoplasias de crianças e adolescentes, a indústria farmacêutica iniciou esse investimento a partir de junho de 2017, resultado de decreto lei americano que exige das indústrias farmacêuticas esse tipo de desenvolvimento específico.

Dessa forma, apresentamos a seguir um projeto que explora as duas metodologias, NGS e ddPCR, com o objetivo de desenvolver novas formas de diagnóstico, acompanhamento e detecção precoce de recaída, para aumentar as chances de cura, possibilitando uma vida produtiva e com qualidade.

B.4. PROJETO DE PESQUISA – APRESENTAÇÃO

1. Introdução

1.1 A medicina de precisão e a biópsia líquida

A medicina de precisão é definida como a seleção de terapias direcionadas para a melhor compreensão da base genética da doença. Na oncologia, o conceito de medicina de precisão é contínuo, resultando em desafios e demandas cada vez maiores no que se refere ao diagnóstico, prognóstico e previsão de resistência ao tratamento [1-3]. Embora as descobertas de terapias alvo, capazes de atingir alterações genômicas específicas, tenha revolucionado o tratamento de pacientes com câncer, a heterogeneidade tumoral continua a ser um obstáculo assustador para os clínicos que precisam otimizar regimes terapêuticos baseados no genoma do câncer de um indivíduo [4]. Os desafios incluem a enorme complexidade biológica e clínica das neoplasias, somado a outros complicadores como a heterogeneidade intratumoral, o impacto do microambiente tumoral e a instabilidade genética das células neoplásicas, resultando na aquisição frequente de mutações novas [5-8].

Dessa forma, devido a essas características inerentes ao processo neoplásico, as biópsias de tecidos representam o padrão de diagnóstico oncológico atual e, frequentemente, refletem apenas um único ponto no tempo, de um único sítio do tumor [3, 9]. Como a diversidade genética molecular intratumoral também pode ser modificada ao longo do tempo, as decisões de tratamento, baseadas exclusivamente em informações históricas de biópsias, podem ser potencialmente imprecisas e subótimas [10, 11]. Além disso, os procedimentos de biópsias cirúrgicas são dificultados por fatores como custos, tempo, comorbidades, repetibilidade limitada e idade do paciente, que podem levar a complicações clínicas [2]. Essas questões são ainda mais evidentes dentro da oncologia pediátrica, onde os pacientes são muito jovens e a disponibilidade de material biológico é reduzida, quando comparada com outras faixas etárias [12].

Apesar dos problemas clínicos em curso, o advento de novas tecnologias menos invasivas, buscando biomarcadores novos e mais abrangentes, tem efetivamente colaborado para o desenvolvimento, na oncologia, da medicina de precisão [13]. Testes minimamente invasivos, conhecidos como "biópsias líquidas", têm sido intensamente investigados nos últimos anos e foram listados como um dos principais avanços tecnológicos em 2015 pela *MIT Technology Review* [14]. As "biópsias líquidas" são baseadas na análise de células tumorais circulantes (CTCs), vesículas extracelulares e ácidos nucleicos livres de células (cfNAs-*cell free nucleic acids*), derivados do tumor e de seus sítios metastáticos, em tecidos como, por exemplo, sangue periférico [8, 15-21].

Durante a última década, houve um grande aumento no número de estudos relacionados aos cfNAs, tais como ctDNA (*circulating DNA*), cfRNA (*cell-free RNA*) e microRNA (*microRNA*), presentes no soro, plasma e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com câncer [3, 8]. A detecção de cfNAs nesses tecidos de pacientes

oncológicos pode ter a função de uma “biópsia líquida”, a qual pode ser utilizada em diversas aplicações clínicas, desde o diagnóstico até o acompanhamento de recidiva da doença, evitando a necessidade de novas biópsias de tecido [22, 23].

Inicialmente, a identificação e quantificação das alterações moleculares no câncer basearam-se principalmente em reações em cadeia da polimerase (PCR). No entanto, o uso das tecnologias tradicionais, baseadas em PCR, pode negligenciar alterações genéticas raras, uma vez que seu sinal de amplificação é amplamente diluído nas seqüências de DNA selvagem, eventualmente impedindo sua identificação [23]. O desenvolvimento de tecnologias mais recentes, como os sequenciamentos de nova geração (NGS) e o PCR digital (ddPCR), permitiram a identificação de alterações genéticas raras com maior sensibilidade, reprodutibilidade e precisão. Entre as metodologias para análise de biópsias líquidas, o NGS permite analisar milhões de moléculas ao mesmo tempo, e os dados da seqüência são então alinhados contra um genoma de referência para identificar alterações genéticas ou epigenéticas [8, 24]. O ddPCR, por sua vez, tornou-se uma ferramenta essencial, pois permite a detecção sensível de mutações raras, quantificação precisa de variações do número de cópias, avaliação do estado de metilação e alterações nos níveis de expressão gênica [20, 25-27]. Devido à crescente viabilidade de sequenciamento e análise do material genético de tumores, a custos acessíveis, a oncologia orientada por genoma parece estar dentro do alcance para melhorar o manejo clínico de pacientes com câncer [3, 28-30].

Devido a incidência e ao espectro das neoplasias em humanos, a aplicabilidade das biópsias líquidas para determinação de alterações genéticas e o monitoramento terapêutico, principalmente dos tumores sólidos malignos, tem sido quase que exclusivamente explorado em pacientes adultos, com tumores epiteliais [12]. As

neoplasias da infância variam significativamente das neoplasias de adultos em relação à incidência e aos tipos de tumores mais frequentes e, portanto, também exibem um espectro inteiramente distinto de mutações associadas. Além disso, uma grande proporção das neoplasias pediátricas é de origem mesenquimal e caracterizada pela presença de genes de fusão recorrentes como resultado de translocações cromossômicas [31].

1.2 Leucemias e Sarcomas da Infância e adolescência

A gênese e progressão das neoplasias são ativadas pela função alterada de genes que regulam os processos de proliferação, apoptose, estabilidade genômica, angiogênese, invasão e metástase. Diversos mecanismos, entre eles, as alterações cromossômicas, podem alterar a função gênica, sendo esses mecanismos variáveis entre os tumores. As alterações genéticas e seus transcritos são características das leucemias e dos tumores sólidos da infância e adolescência e podem ser detectadas usando métodos de citogenética e biologia molecular. A descoberta e a avaliação funcional dos genes envolvidos nestes eventos são essenciais tanto para o entendimento da biologia do câncer, como para a aplicação clínica e identificação de alvos terapêuticos [32].

Os principais subtipos de leucemia linfóide aguda (LLA) e de leucemia mielóide aguda (LMA) envolvem uma grande variedade de alterações genéticas, incluindo mutações de ponto, deleções e alterações cromossômicas numéricas e estruturais, como a hiperdiploidia e as translocações [33]. A LLA é a neoplasia mais comum na infância e embora mais do que 80% dos pacientes sejam curados, as recidivas em LLA ainda são a principal causa de morbidade e mortalidade [34]. Rearranjos cromossômicos resultam na expressão de genes de fusão, que são a marca registrada das LLAs e

comumente envolvem fatores de transcrição, modificadores epigenéticos, receptores de citocinas e tirosina cinases [33].

As translocações mais comuns, observadas na LLA de linhagem B, são: a $t(12;21)(p13;q22)$, que resulta na expressão do gene de fusão *ETV6-RUNX1* (também conhecido com *TEL-AML*); a $t(1;19)(q23;p13)$, que resulta na fusão dos genes *TFPT-PBX1* (*E2A-PBX1*) e a $t(9;22)(q34;q11.2)$, que resulta na formação de um cromossomo denominado *Philadelphia*, e na expressão do gene fusão *BCR-ABL1*. Devido a diferentes pontos de quebra, este último rearranjo pode apresentar dois transcritos distintos, p190 e p210, onde as duas variantes estão associadas a tipos distintos de leucemias, LLA e LMC, respectivamente. O teste molecular para a quantificação dos transcritos do gene de fusão *BCR-ABL1*, através da metodologia da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), com quantificação absoluta, é atualmente a técnica de rotina mais sensível para o monitoramento da resposta ao tratamento em pacientes. No tratamento com inibidores de tirosina cinase, a técnica é a mais apropriada para pacientes que apresentaram resposta citogenética completa e pode ser usada para definir os níveis de resposta molecular específicos associados com a terapêutica [35].

Outro grupo de translocações, presentes nas LLA-B, são as que envolvem a região 11q23, onde está localizado o gene *MLL*, e que dependendo da translocação pode dar origem a diversos genes de fusão. As alterações citogenéticas envolvendo rearranjos do gene *MLL*, têm grande importância no estudo das leucemias infantis, constituindo a alteração citogenética mais comum em LMA da infância, ocorrendo em 15 a 20% destas. Em crianças com até um ano de idade, rearranjos do gene *MLL* são muito frequentes podendo chegar a 85% dos casos.

Comumente classificados como grupos de maior risco, tanto as LMAs com rearranjos envolvendo *MLL* quanto as LLAs em crianças até 1 ano de idade, apresentam-se como doenças com resultados heterogêneos. Nas LMAs, estudos mostraram que piores ou melhores resultados dependem, entre outros fatores, do cromossomo parceiro nas translocações envolvendo o gene *MLL*. Sendo assim, a definição do parceiro do cromossomo 11 na translocação pode conferir diferentes prognósticos para esses casos, permitindo beneficiar os pacientes com escolhas de estratégias de tratamento mais adequadas [36].

A amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (iAMP21) é uma alteração cromossômica recorrente detectada em ~2% dos pacientes com LLA-B. Esta frequência é ainda maior em crianças e adolescentes mais velhos com LLA de precursor de células B. Embora o nível e a extensão da região amplificada no cromossomo 21 possam variar entre os pacientes, a região 21q22.12, que contém o gene *RUNX1* está comumente amplificada, sem exceção. Estudos clínicos mostraram que todos os pacientes com iAMP21 têm um risco aumentado de recaída e uma sobrevida significativamente inferior em comparação aos pacientes sem essa alteração genética [37].

Estudos de genômica têm identificado um grande número de alterações no número de cópias (CNV) e mutações que tipicamente afetam genes envolvidos no ciclo celular, transcrição, diferenciação e proliferação linfóide. Ao contrário das alterações cromossômicas, que comumente são eventos iniciadores da leucemogênese, geralmente as CNVs são alterações que colaboram e estão correlacionadas a subtipos citogenéticos específicos [38]. Diversos estudos têm registrado um pior prognóstico para pacientes com estas alterações, especialmente as deleções dos genes *IKZF1* e *CRFL2*, mas ainda não há uma visão consensual de como incorporar os novos resultados

na estratificação de risco atual. O maior fator complicador é a frequência com que estas alterações secundárias, quando consideradas de baixo risco, coexistem com outros subtipos genéticos de alto risco, como os subtipos *iAMP21*, *BCR-ABL1* e particularmente, o *BCR-ABL1-like*. O subtipo *BCR-ABL1-like* é definido por uma assinatura gênica similar à observada nos casos *BCR-ABL1*, mas ocorre em pacientes que não apresentam este gene de fusão. A presença do fenótipo *BCR-ABL1-like* é enriquecido pela presença de deleções nos genes *IKZF1* e *CDKN2A/B*, mutações em *JAK2* e rearranjos gênicos de *CRFL2* [34, 38].

Os principais determinantes prognósticos em LMA são o cariótipo e as alterações moleculares do blasto leucêmico, permitindo a classificação dos pacientes em grupos de risco de recidiva alto, intermediário e baixo [39]. Além das alterações que são observadas pela citogenética clássica, têm sido descritas em blastos de LMA alterações submicroscópicas, conferindo prognósticos distintos. Estão incluídas entre estas alterações as mutações em genes receptores de tirosina cinase, como *FLT3* e *C-KIT*; oncogenes como *NRAS* e fatores de transcrição como *CEPBPA* e *NPM1* [40-42].

Do ponto de vista genético, os sarcomas podem ser divididos em dois grupos principais distinguíveis através dos achados citogenéticos. Um grupo é caracterizado pela presença de cariótipos relativamente simples, próximos à diploidia, com poucas e específicas alterações cromossômicas. O segundo grupo apresenta cariótipos complexos, com alto grau de instabilidade genômica. Apesar da diversidade genética observada entre os sarcomas, a comparação entre esses dois grupos citogeneticamente distintos supre uma ferramenta conceitual para o melhor entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na sarcomatogênese [43].

O primeiro grupo, de cariótipos com alterações específicas, inclui o Rabdomyosarcoma (RMS), Sarcoma de Ewing (SE) e Sarcoma Sinovial (SS). Esses tumores

apresentam translocações cromossômicas específicas, que geram genes de fusão de fatores de crescimento relacionados a cascatas de sinalização importantes. As translocações auxiliam no diagnóstico e algumas vezes são marcadores prognósticos ou preditivos com forte impacto no manejo clínico dos pacientes. Além disso, também representam potenciais alvos terapêuticos, para o desenvolvimento de novas terapias, tão necessárias para melhorar os índices de sobrevida desses tumores [43].

O rhabdomyosarcoma (RMS) é o tumor mais frequente, dentre os sarcomas de partes moles, durante as duas primeiras décadas de vida. Existem várias classificações histopatológicas, mas em crianças, observam-se basicamente dois tipos: alveolar (ARMS) e embrionário (ERMS). Aproximadamente 60% são embrionários, com prognóstico mais favorável, enquanto 30% são alveolares e mais agressivos, com disseminação precoce e pior resposta ao tratamento. Muitas vezes o diagnóstico histológico não é conclusivo, podendo haver uma indefinição entre os dois tipos de RMS. Assim, diversas estratégias moleculares têm sido utilizadas no refinamento do diagnóstico [44].

No tipo ARMS, existem duas translocações recorrentes e mutuamente exclusivas, $t(2;13)(q35;q14)$ e $t(1;13)(p36;q14)$, que resultam nos genes de fusão, *PAX3-FKHR* e *PAX7-FKHR*, respectivamente. As fusões *PAX3/PAX7-FKHR* atuam como um transativador mais potente, com atividade transcricional maior do que a do gene *PAX* selvagem. Em termos de morbidade, os tumores, positivos para os rearranjos *PAX3/PAX7-FKHR*, representam o conjunto de RMSs pediátricos clinicamente mais difíceis de manejar. A avaliação morfológica algumas vezes é insuficiente para orientar a crítica distinção clínica necessária entre ARMS e ERMS uma vez que alguns ARMSs

perdem a arquitetura alveolar e os ERMSs podem ter aumento de celularidade e serem pouco diferenciados [45].

Outro tumor que acomete crianças e adolescentes com uma frequência relativamente alta é o sarcoma de Ewing (SE). Ele é o segundo sarcoma ósseo mais frequente, ocorrendo em cerca de 11 a 15% dos casos. O SE faz parte de uma família de tumores conhecida como tumores da família Ewing (ESFT), a qual inclui o SE ósseo, o SE de partes moles, tumores de células pequenas da região tóraco-pulmonar (tumor de Askin) e tumor neuroectodérmico primitivo (PNET). O SE também está associado à presença de translocações cromossômicas específicas. A mais comum é a $t(11;22)(q24;q12)$, que forma o gene de fusão *EWS-FLI1* e codifica um fator de transcrição aberrante presente em cerca de 85% dos casos. Em 10 a 15% dos casos, forma-se o gene de fusão *EWS-ERG*, advindo da translocação $t(21;12)(q22;q12)$. No restante dos casos, 1 a 5%, ocorre translocações entre o gene *EWS* e outros genes da família *ETS* [46].

O sarcoma sinovial (SS) também é um sarcoma muito comum em crianças e adolescentes, representando cerca de 5 a 10% dos sarcomas de partes moles. Em mais de 90% dos casos, ocorre uma translocação $t(X,18)(p11.2;q11.2)$ entre os genes *SYT* (synaptotagmin I) e *SSX 1/2* (synovial sarcoma, X breakpoint 1/2), originando os genes de fusão *SYT-SSX1* ou *SYT-SSX2*. A fusão entre os genes *SYT* e *SSX1* ocorre em 61% dos casos e entre os genes *SYT* e *SSX2* em 37% dos casos. Variantes foram descritas, mas são bem raras e ocorrem em casos isolados. A translocação *SYT-SSX1* está relacionada a um pior prognóstico para o paciente portador quando comparada com pacientes com a translocação *SYT-SSX2*. As translocações, no SS, parecem estar relacionadas ao subtipo histológico: enquanto o subtipo monofásico pode apresentar qualquer um dos dois

genes de fusão, *SYT-SSX1* e *SYT-SSX2*, o subtipo bifásico apresenta somente o *SYT-SSX1* [47-49].

1.3 Tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) da infância

Entre crianças menores de 15 anos, os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) são os mais frequentes [50], e a sobrevida livre de eventos em 5 anos passou de 57%, em 1977, para 75% em 2007. Apesar disso, os tumores do SNC ainda são a maior causa oncológica de morte entre 0 a 19 anos, com uma incidência de 5.57 a cada 100,000 indivíduos [51-53].

Os gliomas de baixo grau são os tumores de fossa posterior mais comuns, sendo responsáveis por mais de 50% de todos os tumores do SNC da infância [50, 54], e dentre esses, o astrocitoma pilocítico (grau I da OMS) é o mais comum, representando 85% dos gliomas cerebelares [54]. Quase todos os astrocitomas pilocíticos cerebelares apresentam ativação da via MAPK/ERK, associado ao gene de fusão *KIAA1549-BRAF*, resultando no aumento de expressão da proteína BRAF, além de poderem apresentar a mutação *BRAF V600E* [55-58]. Diferente dos gliomas difusos de baixo grau de adultos, os gliomas difusos ou astrocitomas difusos da infância (grau II da OMS) raramente apresentam mutações nos genes *IDH1* (isocitrate dehydrogenase 1) e *IDH2* (isocitrate dehydrogenase 2) [55]. A maioria dos astrocitomas II apresentam alterações nos genes *MYB* (MYB proto-oncogene), *MYBL1* (MYB proto-oncogene like 1), *FGFR1* (fibroblast growth factor receptor 1) e *BRAF* (B-Raf proto-oncogene, serine) [59], sendo que as alterações em *MYB* e *MYBL1* acometem aproximadamente 25% dos astrocitomas difusos [58, 60]. Ainda, 25% desses tumores apresentam a mutação *BRAF V600E* [55, 61].

Os gliomas de alto grau, por sua vez, são tumores muito heterogêneos e agressivos, que compreendem 15 a 20% de todos os tumores do SNC da infância, geralmente acometem os hemisférios cerebrais, são histologicamente diferentes dos gliomas de baixo grau, e são divididos em astrocitoma anaplasico (grau III da OMS), e glioblastoma (grau IV da OMS) [54, 62]. *PDGFRA* (platelet-derived growth factor receptor), um dos principais reguladores da angiogênese, é o principal alvo de amplificações nesses tumores, estando envolvido na regulação da proliferação, diferenciação neuronal e mobilidade das células [63]. Ainda, mutações em genes que codificam a histona H3.3, como o gene *H3F3A*, foram descritas como *drivers* moleculares frequentes em gliomas de alto grau da infância [62, 64].

Das mutações recorrentes observadas no genoma dos tumores de SNC da infância e adolescência, uma parte tem como alvo proteínas associadas à cromatina, ou proteínas histonas propriamente ditas, resultando em um efeito generalizado sobre a transcrição gênica [62, 65, 66]. Alterações genéticas recorrentes, relacionando a programação epigenética e a formação dos tumores do cérebro são, possivelmente, melhor exemplificadas em glioblastomas e gliomas difusos da ponte na infância, que frequentemente apresentam mutações no gene *H3F3A*, que codifica a variante da histona H3.3. Essas mutações têm como alvo a lisina 27 da histona H3 (K27M), um sítio importante de modificações epigenéticas pós-transcricionais, além dos resíduos vizinhos G34R e G34V [67].

Os ependimomas (EPN) são tumores neuroepiteliais do SNC. Em crianças, 90% dos ependimomas são intra-craniais, e destes, dois terços acometem a região da fossa posterior (FP), e um terço a região supratentorial (ST) [68]. Apesar das similaridades histopatológicas entre variantes do ependimomas de sítios anatômicos diferentes, a

biologia molecular desses tumores é heterogênea, apresentando alterações genéticas e epigenéticas [69]. O primeiro gene *driver* identificado nos ependimomas supratentoriais consiste na fusão entre *RELA* (*RELA proto-oncogene*) e *C11orf95* (*chromosome 11 open reading frame 95*), observado em mais de 70% dos EPN-ST [70].

Recentemente, foram identificados nove subgrupos moleculares de ependimomas, três subgrupos para cada compartimento anatômico do SNC, FP, ST e intra-cranial (IC), baseando-se principalmente no perfil de metilação do DNA, e constatando ainda que os subgrupos moleculares se mantêm estáveis durante o curso da doença. Os ependimomas supratentoriais foram subdivididos em subependimoma supratentorial (SE-ST), ependimoma anaplásico com fusão de *YAP-1* (YY1 associated protein 1) (EPN-ST-*YAP1*), e ependimoma anaplásico com fusão de *RELA* (EPN-ST-*RELA*); Os ependimomas de fossa posterior foram subdivididos em subependimoma de fossa posterior (SE-FP), ependimoma anaplásico de fossa posterior A (EPN-A-FP), ependimoma anaplásico de fossa posterior B (EPN-B-FP); e os ependimomas de tronco foram subdivididos em subependimoma de tronco (SE-T), ependimoma mixopapilar de tronco (EP-MXP-T) e ependimoma anaplásico de tronco (EPN-T) [69].

Dentre os tumores de fossa posterior, os meduloblastomas (MB) são tumores embrionários neuroepiteliais, que se desenvolvem após a desregulação de vias de sinalização celular importantes para o desenvolvimento normal do cerebelo [71]. Além da classificação histológica já conhecida, em 2012 foram definidos quatro principais subgrupos moleculares de MB: WNT, SHH, Grupo 3 e Grupo 4, que levou em consideração alterações genéticas e epigenéticas recorrentes nesse tumor, revolucionando a maneira como esse tumor é visto e estudado [52, 66, 72, 73]. Assim, com base nos achados moleculares a classificação foi revista e, em 2016, a OMS propôs

que os MBs fossem classificados em WNT-ativado, SHH-ativado *TP53* (tumor protein 53) mutado, SHH-ativado *TP53* selvagem, e não WNT/não SHH, que incorpora os tumores pertencentes aos subgrupos 3 e 4 [5]. A partir da classificação molecular proposta para o MB, definiu-se uma nova estratificação de risco para esse tumor: baixo risco, risco intermediário, alto risco, e altíssimo risco, levando em consideração a presença ou não de mutações no gene *TP53* e ampliações dos genes *MYC* e *MYCN* [74].

A atualização da classificação dos tumores do SNC publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016 leva em consideração parâmetros moleculares, além dos biológicos. Essa nova classificação para tumores do SNC considera dados de sequenciamento do genoma desses tumores, e estabelece parâmetros mínimos para incorporar as características moleculares à prática clínica [54]. Assim, os principais tumores do SNC da infância e adolescência passaram a ser classificados em subgrupos moleculares distintos, de acordo com a presença ou ausência de determinadas alterações, permitindo não somente uma classificação precisa, como o acompanhamento adequado do comportamento desses tumores e do manejo clínico desses pacientes [75].

1.4 Retinoblastoma (RB)

Um dos primeiros tumores malignos a ser associado com uma alteração genética foi o Retinoblastoma (RB), um tumor embrionário originado na retina neural, que pode apresentar-se de duas formas clínicas distintas: uma forma bilateral ou multifocal, hereditária (25% de todos os casos), caracterizada pela presença de mutações do gene *RB1* na linhagem germinativa e uma forma esporádica unilateral ou unifocal (75% dos

casos) [76]. RB é o tumor maligno intraocular mais frequentemente encontrado em crianças, representando 2,5% a 4% de todas as neoplasias da infância [77-79]

O sucesso no manejo do RB depende da capacidade de detectar a doença enquanto ainda é intraocular. O estágio da doença está correlacionado com a demora do diagnóstico e, em países em desenvolvimento, o atraso no diagnóstico e tratamento foi fortemente associado com o estágio metastático da doença [80]. A alta taxa de sobrevida observada nos países desenvolvidos, não ocorre nos países em desenvolvimento, nos quais a disseminação extraocular é a principal causa de morte. Enquanto o RB intraocular, não avançado, tem excelente taxa de sobrevida, ao redor de 90-95%, historicamente, pacientes com RB extraocular tem prognóstico pior. O RB extraocular é um problema comum na Oncologia Pediátrica de países menos favorecidos, como o Brasil, e o diagnóstico tardio é o fator determinante da doença avançada [81].

A disseminação do RB pode ocorrer através da extensão do nervo óptico, para o sistema nervoso central (SNC), e/ou através da disseminação hematológica (medula óssea). Embora clinicamente reconhecida, pouco se conhece a respeito da cinética de disseminação do RB [82]. O local da metástase ao diagnóstico ou da recaída interfere diretamente na chance de cura deste grupo de pacientes, sendo que pacientes com doença disseminada para o SNC têm pior prognóstico [83]. Nestes pacientes, a disseminação leptomeníngea é o sítio mais comum de acometimento do SNC. O diagnóstico é realizado através da análise do mielograma das MO, de estudos de imagem e da avaliação citológica do líquido cefalorraquidiano – líquido (LCR) [82].

A identificação precoce da disseminação de doença é de extrema importância, pois possibilita a intensificação do tratamento e o resgate de pacientes com doença

avançada. No entanto, níveis muito baixos de doença não podem ser detectados pelas técnicas disponíveis atualmente, como os estudos citológicos, morfológicos e de imagem; e a informação a respeito de alvos moleculares disponíveis em RB ainda é limitada, o que dificulta ainda mais a possibilidade de investigação de doença minimamente disseminada (DMD) [82, 84]. Diante deste problema, a identificação de marcadores tumorais específicos para RB e o desenvolvimento de técnicas moleculares mais sensíveis, poderiam aumentar a sensibilidade padrão e potencialmente possibilitar a análise molecular [83, 84].

Alguns estudos têm proposto a expressão de fatores de transcrição de células fotorreceptores da retina, como marcadores clínicos, específicos e sensíveis para a análise de DMD, com potencial alvo terapêutico em RB [82, 85-91]. Desde que RB deriva de células precursoras da retina, marcadores linhagem-específicos seriam os mais indicados para detecção de células tumorais em tecidos não oculares. Entre estes marcadores, a expressão do gene *cone-rod homeobox (CRX)*, um fator de transcrição *OTX-like* crítico para diferenciação de fotorreceptores e para manutenção do desenvolvimento normal da retina, tem sido relatada como sendo uniformemente expressa em RB [82, 84, 91-93]. Outro marcador expresso por fotorreceptores é a proteína ligante de retinol 3 (*RBP3*), uma glicoproteína dependente da transativação de *CRX*. A detecção molecular de *RBP3* também já foi descrita na detecção do RB disseminado, principalmente para o monitoramento da efetividade da quimioterapia [85, 90, 94-96]. No entanto, mesmo utilizando métodos de biologia molecular baseados em PCR, na sua maioria, esses estudos ainda encontraram limitações, relacionadas principalmente, a sensibilidade das metodologias e à escassez de material disponível para análise [84, 85, 90-92, 94-96].

A investigação de “biópsias líquidas” de LCR e plasma de pacientes com RB, através de ddPCR, ainda é inédita. Recentemente, um único estudo, a partir de *cell-free* DNA de humor aquoso e o respectivo DNA tumoral, foi capaz de detectar a mesma mutação, c.1075A, no gene *RB1*, em ambas as amostras, utilizando NGS e sequenciamento direto de Sanger [97]. Apesar do evidente avanço, o estudo apresentou limitações, principalmente a respeito da viabilidade das biópsias líquidas de humor aquoso, uma vez que a técnica para a obtenção deste material na rotina clínica é extremamente complexa, envolvendo riscos de complicações e de amostragem inadequada [98].

1.5 A medicina de precisão e a oncologia pediátrica

Os estudos envolvendo biópsias líquidas, utilizando ddPCR ou NGS na oncologia pediátrica, ainda são escassos e invariavelmente estão restritos a grupos de pesquisa da Europa e América do Norte [31, 87, 99-116]. Replicar os modelos de análise de biomarcadores e sequenciamento em larga escala, propostos por esses estudos, implica em algumas questões que podem impactar diretamente os resultados esperados. A primeira delas diz respeito as amostras investigadas, que na sua grande maioria são formadas a partir de populações com pouca ou nenhuma miscigenação, cenário este, absolutamente contrário ao observado na população brasileira. Além das alterações presentes no genoma tumoral, o perfil genômico do hospedeiro, com sua alta variabilidade interindividual, é um fator determinante na evolução do câncer [117]. Assim, é importante o desenvolvimento de modelos e protocolos voltados para a população de estudo.

Outra importante questão e não menos impactante está relacionada aos custos dos painéis propostos, onde as ofertas de testes moleculares direcionados a assistência clínica, não se encaixam no orçamento dos países em desenvolvimento [118]. As características morfológicas e moleculares intrínsecas as neoplasias da infância e adolescência dificultam o desenvolvimento de protocolos moleculares, com aplicabilidade clínica e viabilidade econômica, para o diagnóstico e acompanhamento da doença. Essa questão torna-se ainda mais crítica em países em desenvolvimento, como o Brasil, onde além das particularidades biológicas das neoplasias da infância, a realidade sócio-econômica colabora para o diagnóstico tardio e a disseminação da doença [118].

Dessa forma, o presente estudo propõe a análise de “biópsias líquidas”, através de ddPCR, e o desenvolvimento de painéis moleculares personalizados e direcionados especificamente para a população oncopediátrica, por NGS. Além disso, a proposta é procurar por novos marcadores moleculares para aquelas neoplasias que ainda não são bem caracterizadas, para análise de disseminação de doença. Os resultados deste estudo podem, pela primeira vez, redefinir um novo padrão para o diagnóstico e tratamento das neoplasias da infância e adolescência no Brasil, contribuindo significativamente para a melhora da sobrevida deste grupo de pacientes.

2. Justificativa

As curvas de sobrevida dos pacientes submetidos ao tratamento convencional, baseado na poliquimioterapia, alcançaram um *plateau*, mesmo nos grupos de neoplasias onde já foram alcançadas altas taxas de cura, ainda há uma porcentagem de pacientes maus respondedores ao tratamento, refratários recidivantes, que morrerão

pela doença. O tratamento do câncer tem se voltado cada vez mais para o desenvolvimento de terapias alvo, na tentativa de resgatar, inclusive, esse subgrupo de pacientes. Para isso, torna-se imprescindível a investigação genética das alterações somáticas em genes associados a neoplasias específicas. Esta já é uma realidade possível, a partir do uso de tecnologias modernas e de pessoal capacitado. O cenário é promissor, e precisamos nos preparar para introduzir na prática clínica metodologias cada vez mais sensíveis, como o PCR digital, e painéis específicos para neoplasias da infância e adolescência, através da estratégia de NGS.

3. Hipótese

As alterações e marcadores genéticos selecionados para serem investigados neste estudo serão capazes de determinar grupos moleculares e fatores prognósticos distintos nos pacientes portadores de neoplasias da infância e adolescência.

4. Objetivo Geral

Detectar e identificar alterações moleculares, com potencial marcador prognóstico, em leucemias e tumores sólidos da infância e adolescência.

5. Objetivos Específicos

- Investigar amostras de tumores do sistema nervoso central, sarcomas, leucemias e retinoblastoma, utilizando a estratégia de NGS através de painéis específicos para neoplasias da infância e adolescência

- Identificar e quantificar a expressão do mRNA dos genes *CRX* e *RBP3* em amostras de LCR, MO bilateral, SP e PL de pacientes portadores de RB de alto risco,

através da técnica de ddPCR e associar a presença da expressão gênica dos potenciais marcadores moleculares à detecção de doença minimamente disseminada

- Determinar o papel prognóstico dos marcadores moleculares investigados, a partir da correlação dos resultados dos achados moleculares com os aspectos clínico-histopatológicos dos pacientes.

6. Procedimentos metodológicos

6.1 Desenho do estudo

Estudo longitudinal de coorte retrospectiva e prospectiva.

6.2 Participantes de pesquisa e tamanho amostral

Serão avaliados todos os pacientes com idade inferior a 18 anos, com entrada no serviço do Instituto de Oncologia Pediátrica/Grupo de Apoio ao adolescente e a Criança com Câncer (IOP/GRACC-UNIFESP), do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo, no período de 36 meses, com os seguintes diagnósticos: LLA, LMA, SE, RMS, SS, MB, EP, Gliomas e RB de alto risco. Todos os pacientes serão tratados de acordo com o protocolo institucional, específico para cada tipo de neoplasia, da época da realização do estudo.

A coleta prospectiva será realizada de acordo com o fluxo de entrada dessas neoplasias no IOP/GRACC-UNIFESP, totalizando aproximadamente 225 pacientes, ao final do terceiro ano do desenvolvimento do projeto. O instituto recebe cerca de vinte casos de leucemia por ano, sendo que, desse total, 75% são de LLA e 25% são de LMA. Entre os tumores sólidos, no grupo dos sarcomas ósseos, extra-ósseos e de partes moles são recebidos cerca de 10 casos/ano, entre SE, RMS e SS. Entre os tumores do SNC, são

recebidos cerca de 40 casos/ano, sendo na sua maioria os gliomas, seguidos de MB e EP. Para o RB de alto risco, a média é de 5/ano pacientes portadores de retinoblastoma extraocular ou intraocular avançado (Grupos D e E - olhos com risco extremo, que sofreram alterações anatômicas e funcionais definitivas). Os pacientes não serão submetidos a nenhum tipo de procedimento adicional para a coleta das medulas ósseas, nem dos fragmentos tumorais utilizados no estudo.

Com relação as coletas, entre os pacientes com LLA e LMA serão obtidas amostras de medula óssea e/ou sangue periférico (2 ml), colhidas em EDTA, ao diagnóstico. Entre os pacientes com tumores sólidos, sarcomas e tumores do SNC, será coletado um fragmento tumoral, imediatamente criopreservado após a coleta. Este fragmento será parte da amostra que é coletada durante o procedimento biópsia/cirurgia, realizado para diagnóstico histopatológico e/ou tratamento.

Entre os pacientes com RB avançado, as coletas serão a partir de 2ml de cada uma das amostras de LCR, MO bilateral e SP (o plasma será obtido após a centrifugação do volume de 2,0ml do sangue periférico), coletadas em 3 momentos do tratamento: diagnóstico, após o fim de dois ciclos de quimioterapia e ao final do tratamento serão obtidas amostras de 2-3ml de LCR, coletadas ao diagnóstico, durante e ao final do tratamento. Os pacientes elegíveis para o grupo controle serão aqueles com diagnóstico de LLA e LMA, que são atendidos e realizam tratamento no IOP/GRAAC-UNIFESP. As linhagens celulares Y79 (ATCC/HT18™) e WERI-Rb-1 (RIKEN/RCB2146) proveniente de RB e ARPE-19 (ATCC/CRL-2302™), proveniente de retina normal, serão utilizadas como controles do teste de sensibilidade.

Todos os pacientes participantes serão incluídos, apenas após o aceite e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Informado (TCLI), após a submissão e

aprovação da presente proposta ao Comitê de Ética em Pesquisa, da Universidade Federal de São Paulo (CEP-UNIFESP), autorizando o uso das amostras para a pesquisa e o teste clínico, de maneira anônima. Todos os indivíduos menores de 18 anos serão apresentados e assinarão, quando em concordância, um Termo de Assentimento, também submetido e aprovado pelo CEP da UNIFESP.

Todas as amostras, de pacientes e controles, de MO bilateral e SP serão coletadas em tubos com EDTA. Os fragmentos de tumores sólidos serão coletados em tubos criogênicos. As amostras de LCR serão coletadas em tubo seco. As amostras serão imediatamente refrigeradas e encaminhadas ao Laboratório de Investigações Genéticas das Neoplasias da Infância e da Adolescência, do IOP-GRAACC/UNIFESP. O processamento e avaliação serão realizados sob as mesmas condições para todas as amostras.

Retrospectivamente, também serão estudadas células de medula óssea e fragmentos tumorais criopreservados no Biobanco do IOP/GRAACC-UNIFESP, aprovado pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), sob o número de registro B-053, com mais de 10.000 amostras de aproximadamente 5.000 pacientes portadores de diversas neoplasias da infância e adolescência. Deste banco serão incluídas 40 amostras de medula óssea de pacientes com LLA e 30 de LMA, 55 fragmentos tumorais de sarcomas, 150 de tumores SNC e 350 amostras de sangue periférico de pacientes com RB (esporádico e germinativo). Biobanco do IOP/GRAACC-UNIFESP permite a padronização e validação de novas metodologias, bem como a caracterização de um perfil dessas neoplasias, uma vez que a instituição recebe pacientes de todas as regiões do Brasil.

6.2.1 Critérios de inclusão

Pacientes com idade até 18 anos, com diagnósticos de LLA, LMA, sarcomas ósseos e extra ósseos (SE, RMS e SS), tumores de sistema nervoso central (MB, EPN e Gliomas) e RB de alto risco, admitidos no IOP-GRAACC/UNIFESP.

6.2.2 Critérios de exclusão

Amostras com RNA e ou DNA de qualidade, concentração e volume insuficientes. Amostras apresentando $A_{260}/A_{280} < 1.8$, concentração de RNA menor do que $1\mu\text{g}$ e de DNA menor do que 100ng e volumes inferiores a $10\mu\text{l}$, serão excluídas do estudo, pela impossibilidade de realizar os protocolos.

6.3 Descrição do local do estudo

O Laboratório de Investigação Genética das Neoplasias da Infância e Adolescência do Instituto de Oncologia Pediátrica foi instalado e iniciou as suas atividades em maio de 2001, a partir de um programa da Fundação Banco do Brasil, denominado Criança e Vida. O laboratório é equipado com toda a estrutura necessária para a elaboração e execução de técnicas de citogenética e biologia molecular, desde a identificação de translocações cromossômicas e de mutações, deleções/duplicações, até a quantificação de rearranjos gênicos. O laboratório contém freezers de temperatura ultrabaixa e tanques de nitrogênio líquido para arquivo de amostras biológicas, um microscópio de fluorescência para avaliação dos rearranjos gênicos por sondas de DNA, dois equipamentos de PCR em Tempo Real para a quantificação destes rearranjos, dois termocicladores para amplificação das sequências de DNA e RNA de

interesse e um sequenciador automático de eletroforese capilar, para validação de mutações, deleções e duplicações de genes específicos.

Por estar inserido em um hospital escola, com programas de residência e de pós-graduação médica e multiprofissional, a disseminação do conhecimento no IOP/GRAACC-UNIFESP é contínua e intrínseca a sua estrutura. Além disso, a instituição sede tem parceria técnico-científica com diversas outras instituições internacionais, tanto em países desenvolvidos, como The Hospital for Sick Children, em Toronto e St. Jude Children's Research Hospital, nos EUA; quanto em países da América do Sul, como Chile, Argentina e Uruguai, estes últimos países em desenvolvimento, com quem o Brasil divide desafios semelhantes no combate ao câncer infantil. Desta forma, os resultados deste estudo têm o potencial de não apenas estabelecer testes moleculares, com medicina de precisão, para reestadiamento e acompanhamento dos pacientes oncopediátricos, como também, uma vez sendo desenvolvido em uma instituição como IOP/GRAACC-UNIFESP há uma chance maior de aplicabilidade clínica e compartilhamento da informação.

6.4 Planejamento do estudo

6.4.1 Identificação de *hotspots* de mutações, amplificação gênica e transcritos de genes de fusão, através da análise de NGS (Sequenciamento de Nova Geração)

Para o presente estudo serão selecionadas 850 amostras entre medulas ósseas com diagnóstico de LLA e LMA, e fragmentos tumorais de SE, RMS, SS, MB, EP, Gliomas e RB de alto risco, que serão submetidas a análise de NGS. O DNA e o RNA de todas as amostras tumorais e medula ósseas serão extraídos utilizando o kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen[®]), que permite a extração simultânea e de alta qualidade das moléculas

de ácido nucléico, a partir de uma mesma amostra. O DNA e o RNA serão quantificados utilizando o 4200 TapeStation System (Agilent®). O cDNA será sintetizado a partir do RNA utilizando a enzima SuperScript Vilo (ThermoFisher Scientific®) e será utilizado 10ng do material genômico de cada amostra para o preparo das bibliotecas, utilizando o sistema Ion Chef™ (ThermoFisher Scientific®), seguindo o protocolo do fabricante. Após a finalização do preparo, as bibliotecas serão carregadas no chip selecionado (Ion 510™ e Ion 540™ - ThermoFisher Scientific®) e estes serão inseridos no sequenciador Ion S5™ (ThermoFisher Scientific®).

Serão utilizados painéis desenvolvidos especificamente para as principais alterações descritas nas neoplasias da infância e adolescência. Serão abordadas regiões de *hotspot*, como por exemplo nos genes *ABL1* e *ABL2* para as leucemias, e *CTNNB1* e *TERT* para tumores do SNC; regiões de amplificação gênica, como por exemplo nos genes *MYC* e *MYCN*; sequencias genômicas completas, como por exemplo os genes *TP53*, *RB1*, *GATA1*, *GATA3*, *KDM6A*, *PTCH1*, *NF1*, *NF2* e *SUFU*; e transcritos de fusão, como por exemplo, as fusões envolvendo os genes *BCR* e *ABL*, *PAX3*, *PAX5*, *PAX7*, *RNX1* e *RARA*, entre outros.

Ao final da corrida de sequenciamento, será realizada a análise dos dados gerados pelo sequenciamento em larga escala. Será avaliada a qualidade dos dados brutos de cada leitura e aquelas que não alcançarem os padrões pré-definidos serão removidas ou corrigidas. Serão selecionadas leituras de amplicons que apresentem a razão entre as fitas forward e reverse $\geq 0,6$ e $\leq 1,4$. As leituras obtidas serão alinhadas com o genoma humano de referência hg19/GHCh37, e serão consideradas apenas leituras com a cobertura mínima de 200 vezes. Os arquivos BAM gerados serão analisados utilizando o software IGV (Integrative Genomics Viewer; [98]). Os arquivos

VCF (variant call format) serão analisados na chamada de variantes, e a análise interpretativa será realizada utilizando o software Ingenuity Variant Analysis™ (Qiagen®).

As variantes identificadas serão comparadas com bancos de dados como o COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), que explora o impacto de mutações somáticas em câncer [99, 100], com o dbSNP, que é o repositório público central para variantes genéticas [101], e os bancos de dados de variantes populacionais como 1000 genomes [50, 102], ExAC [103], e AbraOM, que é o único banco de dado disponível de variantes populacionais brasileiras [104]. Por fim, os efeitos patogênicos funcionais das variantes serão avaliados *in silico* utilizando ferramentas de bioinformática, como SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant; [105], PolyPhen [106] e Mutation Taster [107].

6.4.2 Investigação da expressão dos genes *CRX* e *RBP3*, para determinação de disseminação de doença, por ddPCR (droplet digital PCR)

Serão investigadas 300 amostras de LCR, MO bilateral, SP e PL de pacientes com RB de alto risco, coletadas em 3 momentos do tratamento. A extração de mRNA das amostras de LCR e PL será realizada com os reagentes QIAamp Minelute Virus Spin Kit e QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen®), enquanto para a extração mRNA da MO e SP será utilizado o QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen®). As sínteses do DNA complementar (cDNA) serão realizadas a partir de 2µg de cada mRNA, utilizando iScript cDNA Synthesis Kit (Qiagen), de acordo com as normas do fabricante. Após a síntese de cDNA, as amostras serão imediatamente armazenadas em -80°C até a análise da expressão

gênica. Para Quantificação da expressão do mRNA dos genes *CRX* e *RBP3* por Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (ddPCR)

A geração dos *droplets* (gotas) e a transferência das amostras emulsificadas para as placas de PCR serão realizadas de acordo com as instruções do fabricante, utilizando QX100™/QX200™ Droplet Digital PCRsystem (Bio-Rad). As reações de ddPCR serão realizadas em um volume de 10µl de 2X MasterMix ddPCR, 1µl de 20X Primer e TaqMan Probe Mix (*CRX* e *RBP3*), 5µl de água livre de nucleases, and 4µl do produto de cDNA. As amostras serão colocadas no cartucho gerador de droplets. 20µl de cada uma das misturas (amostra + reagentes) serão transferidos para os poços do meio do cartucho, cuidadosamente para evitar bolhas. Nos poços inferiores serão adicionados 70µl de óleo e então, o cartucho contendo as misturas, será colocado dentro gerador de droplets, para que sejam gerados individualmente. Uma vez que este processo estiver completo, 35µl dos droplets serão transferidos para colunas de placas de PCR de 96 poços, que serão colocadas em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems™), segundo o programa: 95°C por 10min, seguido por 40ciclos de 94°C por 30s e 60°C por 1min, seguido por 98°C por 10min. Após a finalização da PCR, a placa será selada e lida em uma leitora de droplets.

Os dados serão analisados usando o software QuantaSoft (Bio-Rad), com os limites de detecção ajustados manualmente, baseados nos resultados dos poços de controles negativos, contendo água livre de nucleases, ao invés de amostras. A sensibilidade das reações de ddPCR será determinada através da semeadura das células Y79 e WERI-Rb-1 em células ARPE-19, em diluições que variarão de 10^{-1} a 10^{-7} .

6.4.3 MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) é uma técnica semi-quantitativa utilizada para determinar o número de cópias relativas de até 60 sequências de DNA em uma única reação de PCR multiplex. Essa metodologia será utilizada para o *screening* das principais deleções e duplicações presentes nas regiões cromossômicas dos marcadores moleculares *iamp21* e *CRFL2*, em 200 amostras de medula óssea de LLA. Além disso, serão investigadas deleções/duplicações de uma ou mais sequências e o padrão de metilação aberrante do promotor do gene *RB1*, em 450 amostras de sangue periférico de pacientes com RB.

Serão utilizados os kits *SALSA MLPA MIX DE SONDA P327 IAMP21*, *SALSA MLPA MIX DE SONDA P329 CRLF2* e *SALSA MLPA MIX DE SONDA P047 RB1* e 5ng de DNA, de cada uma das amostras de medula óssea ou sangue periférico. Após os processos de desnaturação e hibridização das sondas, as amostras serão submetidas às reações de ligação e amplificação em termociclador, de acordo com as normas do fabricante (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands). Posteriormente, essas reações serão submetidas a análise de fragmento, em sequenciador automático de DNA, e a identificação do número de cópias de cada um dos genes analisados será realizada com o auxílio do software Coffalyser.Net.

6.4.4 Análise dos dados

A análise estatística será realizada utilizando os programas GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) e SPSS (SPSS Software, IBM, USA). Variáveis numéricas e categóricas serão comparadas utilizando testes não paramétricos: Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal-Wallis, coeficiente de correlação, Spearman e Friedman.

Variáveis categóricas como; frequência alélica, frequência de mutações, presença/ausência de deleções/inserções/duplicações, faixa etária, gênero, tipo histológico, ocorrência de recidiva e status no último contato, serão estudadas utilizando teste de χ^2 e exato de Fisher. As análises de curvas de sobrevida global e livre de eventos serão realizadas com base no método Kaplan-Meyer e comparadas por teste log-rank. Serão consideradas significantes as análises com valores de $p < 0,05$. Para aumentar o nível de confiança, será calculado o efeito do tamanho da amostra e o poder dos testes, usando o software R Core Team (2016) (URL <http://www.R-project.org/>).

7. Resultados esperados

Espera-se uma melhor caracterização do perfil biológico das neoplasias dos pacientes atendidos nesta instituição, conhecendo a frequência e distribuição das alterações genéticas observadas neste estudo. Uma vez conhecido este perfil biológico, esperamos que, ao correlacionar os achados moleculares aos dados clinicopatológicos, possamos encontrar fatores prognósticos, que possam colaborar para a evolução clínica das neoplasias investigadas. Além disso, ao final do estudo, espera-se alcançar a expertise do conhecimento técnico científico de cada uma das metodologias de ponta utilizadas.

A proposta de identificação de marcadores moleculares para auxílio ao diagnóstico e detecção de doença disseminada permitiria tomada de decisões terapêuticas mais apropriadas, uma vez que as metástases e recidivas de doença seriam diagnosticadas mais precocemente e permitindo; inclusive, o acompanhamento da evolução dos pacientes durante o tratamento. Assim, com os resultados do presente projeto há a possibilidade de desenvolvimento da medicina de precisão na oncologia

pediátrica, com testes moleculares, que poderiam colaborar para uma terapia adjuvante mais personalizada e conseqüentemente com a melhora dos índices de sobrevida dos pacientes com neoplasias da infância e adolescência, principalmente aqueles diagnosticados com doença de alto risco.

8. Aspectos éticos

Todos os pais ou responsáveis legais pelos pacientes assinam o termo de consentimento livre e esclarecido referente ao protocolo terapêutico utilizado na instituição e de congelamento e guarda de amostras, ambos submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Todos os pacientes menores de 18 anos são apresentados e assinam quando em concordância um termo de Assentimento também submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

9. Cronograma de atividades

Atividade	Tipo	Mês Início	Mês Final	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Submissão do projeto para comissão científica do IOP-GRAACC/UNIFESP e posterior submissão ao comitê de ética da Universidade Federal de São Paulo - Brasil		1	3	█																																			
Compra de equipamentos		2	3	█																																			
Seleção de amostras para o estudo		3	10	█																																			
Extração de DNA e RNA dos fragmentos tumorais selecionados		4	34	█																																			
Síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do mRNA dos fragmentos tumorais selecionados		5	34	█																																			
Preparo das bibliotecas para o sequenciamento de nova geração (NGS) no Ion Chef (ThermoFisher Scientific®, #4484177)		9	30	█																																			
Padronização das corridas do sequenciamento de nova geração (NGS) no Ion S5 (ThermoFisher Scientific®, #A27212)		10	20	█																																			
Corridas do sequenciamento de nova geração (NGS) no Ion S5 (ThermoFisher Scientific®, #A27212) - Chip 540		16	30	█																																			
Corridas do sequenciamento de nova geração (NGS) no Ion S5 (ThermoFisher Scientific®, #A27212) - Chip 510		16	30	█																																			
Análise dos dados do sequenciamento de nova geração (NGS)				█																																			
Momento 1	Parcial	19	23	█																																			

Momento 2	<i>Final</i>	30	35
Padronização da extração e quantificação do mRNA das amostras de LCR e PLA dos pacientes com RB e dos controles		6	16
Extração de mRNA e síntese do cDNA das amostras de LCR, MO bilateral, SP e PL		16	30
Padronização das reações de PCR e de ddPCR para detecção e quantificação do mRNA dos genes alvo CRX e RBP3 sintase e do endógeno GAPDH		17	21
Deteção e quantificação do mRNA dos genes alvo CRX e RBP3 e análise de DMD nas amostras de LCR e MO dos pacientes com RB extraocular e controles		21	30
Padronização das reações de MLPA		4	6
Reações de MLPA		6	30
Coleta de dados dos pacientes		3	34
Análise dos dados e confecção dos manuscritos		24	34
Relatório de prestação de contas para o Ministério da Saúde			
	<i>Parcial</i>	11	12
	<i>Parcial</i>	23	24
	<i>Final</i>	35	36
Relatório para o Ministério da Saúde			
	<i>Final</i>	35	36

10. Atividades de monitoramento e de avaliação

O acompanhamento das atividades de pesquisa previstas neste projeto ficará a cargo do coordenador indicado nominalmente no início do projeto como pesquisador principal. As informações resultantes do monitoramento serão consolidadas ao final do ano para construção do relatório anual, o qual permitirá a observação e análise da evolução das atividades ao longo do tempo, bem como as justificativas para resultados verificados fora das expectativas previstas inicialmente.

11. Produtos gerados com a execução do projeto e formas de disseminação dos resultados do estudo

Neste projeto, prevê-se a produção de 3 relatórios, um por ano de execução, para consolidação dos resultados alcançados. Além disso, propõe-se a participação dos pesquisadores em eventos científicos da área, a fim de debater e divulgar os achados do estudo.

Os resultados encontrados serão apresentados em congressos de oncologia e serão submetidos à publicação em revista da área com fator de impacto relevante. Além disso, os resultados da execução do projeto serão divulgados no Relatório de Atividades do GRAACC, produzido anualmente, e encaminhados para jornalistas e parceiros.

RESULTADO	UNIDADE DE MEDIDA	META
Relatórios parciais e finais de prestação de contas	Relatório de prestação de conta enviado ao MS	3
Relatório final de pesquisa	Relatório de pesquisa enviado ao MS	1
Participação em Congressos / Eventos Científicos	Participantes	4
Publicações	Artigos	3

Endereços do Curriculum Lattes dos envolvidos na execução do projeto:

CV: <http://lattes.cnpq.br/8408786810979968> Silvia Regina Caminada de Toledo

CV: <http://lattes.cnpq.br/3263440529422712> Indhira Dias Oliveira

CV: <http://lattes.cnpq.br/3098652709219670> Bruna Mascaro Cordeiro de Azevedo

CV: <http://lattes.cnpq.br/3183489772126089> Francine Tesser Gamba

12. Referências

1. Prasad, V., T. Fojo, and M. Brada, *Precision oncology: origins, optimism, and potential*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(2): p. e81-e86.
2. Ashley, E.A., *Towards precision medicine*. *Nat Rev Genet*, 2016. **17**(9): p. 507-22.
3. Perakis, S. and M.R. Speicher, *Emerging concepts in liquid biopsies*. *BMC Med*, 2017. **15**(1): p. 75.
4. Hyman, D.M., B.S. Taylor, and J. Baselga, *Implementing Genome-Driven Oncology*. *Cell*, 2017. **168**(4): p. 584-599.
5. McGranahan, N. and C. Swanton, *Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(1): p. 15-26.
6. Yates, L.R. and P.J. Campbell, *Evolution of the cancer genome*. *Nat Rev Genet*, 2012. **13**(11): p. 795-806.
7. McGranahan, N. and C. Swanton, *Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future*. *Cell*, 2017. **168**(4): p. 613-628.
8. Heitzer, E., et al., *The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer*. *npj Precision Oncology*, 2017. **1**(1): p. 36.
9. Gerlinger, M., et al., *Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(10): p. 883-892.
10. Campbell, P.J., et al., *The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer*. *Nature*, 2010. **467**(7319): p. 1109-13.
11. Navin, N., et al., *Tumour evolution inferred by single-cell sequencing*. *Nature*, 2011. **472**(7341): p. 90-4.
12. Krumbholz, M., et al., *Genomic EWSR1 Fusion Sequence as Highly Sensitive and Dynamic Plasma Tumor Marker in Ewing Sarcoma*. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(17): p. 4356-65.
13. Diaz, L.A., Jr. and A. Bardelli, *Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA*. *J Clin Oncol*, 2014. **32**(6): p. 579-86.
14. Simonite, T., *10 Breakthrough Technologies of 2015: Where Are They Now?* MIT Technology Review, 2015. **2015**.
15. Bardelli, A. and K. Pantel, *Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet)*. *Cancer Cell*, 2017. **31**(2): p. 172-179.
16. Alix-Panabieres, C. and K. Pantel, *Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer*. *Clin Chem*, 2013. **59**(1): p. 110-8.

17. Pantel, K. and M.R. Speicher, *The biology of circulating tumor cells*. *Oncogene*, 2016. **35**(10): p. 1216-24.
18. Wan, J.C.M., et al., *Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA*. *Nat Rev Cancer*, 2017. **17**(4): p. 223-238.
19. Siravegna, G., et al., *Integrating liquid biopsies into the management of cancer*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. **14**(9): p. 531-548.
20. Schwarzenbach, H., D.S. Hoon, and K. Pantel, *Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(6): p. 426-37.
21. Ulz, P., et al., *Patient monitoring through liquid biopsies using circulating tumor DNA*. 2017. **141**(5): p. 887-896.
22. Alix-Panabieres, C. and K. Pantel, *Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy*. *Cancer Discov*, 2016. **6**(5): p. 479-91.
23. Bettegowda, C., et al., *Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies*. *Sci Transl Med*, 2014. **6**(224): p. 224ra24.
24. Forsheo, T., et al., *Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(136): p. 136ra68.
25. Haber, D.A. and V.E. Velculescu, *Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(6): p. 650-61.
26. Hudecova, I., *Digital PCR analysis of circulating nucleic acids*. *Clin Biochem*, 2015. **48**(15): p. 948-56.
27. Diehl, F., et al., *Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(45): p. 16368-73.
28. Aceto, N., et al., *Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis*. *Cell*, 2014. **158**(5): p. 1110-1122.
29. Heitzer, E., et al., *Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing*. *Cancer Res*, 2013. **73**(10): p. 2965-75.
30. Yu, M., et al., *Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility*. *Science (New York, N.Y.)*, 2014. **345**(6193): p. 216-220.
31. Chicard, M., et al., *Whole exome sequencing of cell-free DNA reveals temporospatial heterogeneity and identifies treatment-resistant clones in neuroblastoma*. *Clin Cancer Res*, 2017.
32. Albertson, D.G., et al., *Chromosome aberrations in solid tumors*. *Nat Genet*, 2003. **34**(4): p. 369-76.
33. Greaves, M.F. and J. Wiemels, *Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(9): p. 639-49.
34. Mullighan, C.G., *The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012. **2012**: p. 389-96.
35. Roberts, K.G. and C.G. Mullighan, *Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015. **12**(6): p. 344-57.
36. Balgobind, B.V., et al., *The heterogeneity of pediatric MLL-rearranged acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2011. **25**(8): p. 1239-48.

37. Clappier, E., et al., *IKZF1 deletion is an independent prognostic marker in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, and distinguishes patients benefiting from pulses during maintenance therapy: results of the EORTC Children's Leukemia Group study 58951*. *Leukemia*, 2015. **29**(11): p. 2154-61.
38. Moorman, A.V., et al., *A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2014. **124**(9): p. 1434-44.
39. Machado, L.E.S., et al., *Detecção de mutações no gene KIT em leucemia mieloide aguda*. *Einstein (São Paulo)*, 2012. **10**: p. 286-291.
40. Bacher, U., et al., *Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients*. *Blood*, 2006. **107**(10): p. 3847-53.
41. Levine, R.L., *Molecular pathogenesis of AML: translating insights to the clinic*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2013. **26**(3): p. 245-8.
42. Noguera, N.I., et al., *Simultaneous detection of NPM1 and FLT3-ITD mutations by capillary electrophoresis in acute myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2005. **19**(8): p. 1479-82.
43. Helman, L.J. and P. Meltzer, *Mechanisms of sarcoma development*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(9): p. 685-94.
44. Mercado, G.E. and F.G. Barr, *Fusions involving PAX and FOX genes in the molecular pathogenesis of alveolar rhabdomyosarcoma: recent advances*. *Curr Mol Med*, 2007. **7**(1): p. 47-61.
45. Lae, M., et al., *Global gene expression profiling of PAX-FKHR fusion-positive alveolar and PAX-FKHR fusion-negative embryonal rhabdomyosarcomas*. *J Pathol*, 2007. **212**(2): p. 143-51.
46. Riggi, N. and I. Stamenkovic, *The Biology of Ewing sarcoma*. *Cancer Lett*, 2007. **254**(1): p. 1-10.
47. Amary, M.F., et al., *Detection of SS18-SSX fusion transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded neoplasms: analysis of conventional RT-PCR, qRT-PCR and dual color FISH as diagnostic tools for synovial sarcoma*. *Mod Pathol*, 2007. **20**(4): p. 482-96.
48. Ladanyi, M., et al., *Impact of SYT-SSX fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective study of 243 patients*. *Cancer Res*, 2002. **62**(1): p. 135-40.
49. Meyer, W.H. and S.L. Spunt, *Soft tissue sarcomas of childhood*. *Cancer Treat Rev*, 2004. **30**(3): p. 269-80.
50. Ostrom, Q.T., et al., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012*. *Neuro Oncol*, 2015. **17 Suppl 4**: p. iv1-iv62.
51. Birney, E. and N. Soranzo, *Human genomics: The end of the start for population sequencing*. *Nature*, 2015. **526**(7571): p. 52-3.
52. Northcott, P.A., et al., *Medulloblastomics: the end of the beginning*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(12): p. 818-34.
53. Segal, D. and M.A. Karajannis, *Pediatric Brain Tumors: An Update*. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2016. **46**(7): p. 242-250.

54. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. *Acta Neuropathol*, 2016. **131**(6): p. 803-20.
55. Chiang, J.C. and D.W. Ellison, *Molecular pathology of paediatric central nervous system tumours*. *J Pathol*, 2017. **241**(2): p. 159-172.
56. Forsheew, T., et al., *Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas*. *J Pathol*, 2009. **218**(2): p. 172-81.
57. Jones, D.T.W., et al., *Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas*. *Cancer research*, 2008. **68**(21): p. 8673-8677.
58. the St. Jude Children's Research Hospital–Washington University Pediatric Cancer Genome, P., *Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas*. *Nature Genetics*, 2013. **45**: p. 602.
59. Jones, D.T., et al., *Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma*. *Oncogene*, 2009. **28**(20): p. 2119-23.
60. Tatevossian, R.G., et al., *MAPK pathway activation and the origins of pediatric low-grade astrocytomas*. *Journal of Cellular Physiology*, 2010. **222**(3): p. 509-514.
61. Schindler, G., et al., *Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma*. *Acta Neuropathol*, 2011. **121**(3): p. 397-405.
62. Schwartzenuber, J., et al., *Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma*. *Nature*, 2012. **482**(7384): p. 226-31.
63. Rizzo, D., et al., *Molecular Biology in Pediatric High-Grade Glioma: Impact on Prognosis and Treatment*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 215135.
64. Baker, S.J., D.W. Ellison, and D.H. Gutmann, *Pediatric gliomas as neurodevelopmental disorders*. *Glia*, 2016. **64**(6): p. 879-95.
65. Jiao, Y., et al., *Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas*. *Oncotarget*, 2012. **3**(7): p. 709-22.
66. Parsons, D.W., et al., *The genetic landscape of the childhood cancer medulloblastoma*. *Science*, 2011. **331**(6016): p. 435-9.
67. Bjerke, L., et al., *Histone H3.3 mutations drive paediatric glioblastoma through upregulation of MYCN*. *Cancer discovery*, 2013. **3**(5): p. 512-519.
68. Witt, H., et al., *Delineation of two clinically and molecularly distinct subgroups of posterior fossa ependymoma*. *Cancer Cell*, 2011. **20**(2): p. 143-57.
69. Pajtler, K.W., et al., *Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups*. *Cancer Cell*, 2015. **27**(5): p. 728-43.
70. Parker, M., et al., *C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-kappaB signalling in ependymoma*. *Nature*, 2014. **506**(7489): p. 451-5.
71. Roussel, M.F. and M.E. Hatten, *Cerebellum development and medulloblastoma*. *Curr Top Dev Biol*, 2011. **94**: p. 235-82.
72. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. *Acta Neuropathologica*, 2007. **114**(2): p. 97-109.

73. Taylor, M.D., et al., *Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus*. Acta Neuropathol, 2012. **123**(4): p. 465-72.
74. Ramaswamy, V., et al., *Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 821-31.
75. Klonou, A., et al., *Molecular Basis of Pediatric Brain Tumors*. Neuromolecular Med, 2017. **19**(2-3): p. 256-270.
76. Rodriguez-Galindo, C., et al., *Toward the Cure of All Children With Cancer Through Collaborative Efforts: Pediatric Oncology As a Global Challenge*. Journal of Clinical Oncology, 2015. **33**(27): p. 3065-3073.
77. Orjuela, M., et al., *Presence of human papilloma virus in tumor tissue from children with retinoblastoma: an alternative mechanism for tumor development*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(10): p. 4010-6.
78. Orjuela, M.A., et al., *Fruit and vegetable intake during pregnancy and risk for development of sporadic retinoblastoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(6): p. 1433-40.
79. Palazzi, M.A., et al., *Detection of oncogenic human papillomavirus in sporadic retinoblastoma*. Acta Ophthalmol Scand, 2003. **81**(4): p. 396-8.
80. Chantada, G.L., et al., *Strategies to manage retinoblastoma in developing countries*. Pediatr Blood Cancer, 2011. **56**(3): p. 341-8.
81. Antoneli, C.B., et al., *Extraocular retinoblastoma: a 13-year experience*. Cancer, 2003. **98**(6): p. 1292-8.
82. Torbidoni, A.V., et al., *Association of Cone-Rod Homeobox Transcription Factor Messenger RNA With Pediatric Metastatic Retinoblastoma*. JAMA Ophthalmol, 2015. **133**(7): p. 805-12.
83. Chantada, G.L., et al., *An aggressive bone marrow evaluation including immunocytology with GD2 for advanced retinoblastoma*. J Pediatr Hematol Oncol, 2006. **28**(6): p. 369-73.
84. Laurent, V.E., et al., *Detection of minimally disseminated disease in the cerebrospinal fluid of children with high-risk retinoblastoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for GD2 synthase mRNA*. Eur J Cancer, 2013. **49**(13): p. 2892-9.
85. Rodrigues, M.M., et al., *Retinoblastoma. Immunohistochemistry and cell differentiation*. Ophthalmology, 1987. **94**(4): p. 378-87.
86. Gonzalez-Fernandez, F., et al., *Differential expression of interphotoreceptor retinoid-binding protein, opsin, cellular retinaldehyde-binding protein, and basic fibroblastic growth factor*. Exp Eye Res, 1993. **56**(4): p. 411-27.
87. Naru, J., et al., *Identification of differentially expressed proteins in retinoblastoma tumors using mass spectrometry-based comparative proteomic approach*. Journal of Proteomics, 2017. **159**(Supplement C): p. 77-91.
88. Kapatai, G., et al., *Gene expression profiling identifies different sub-types of retinoblastoma*. Br J Cancer, 2013. **109**(2): p. 512-25.
89. Laurent, V.E., et al., *Optimization of molecular detection of GD2 synthase mRNA in retinoblastoma*. Mol Med Rep, 2010. **3**(2): p. 253-9.
90. Rajagopalan, S., et al., *Retinoblastoma. Interphotoreceptor retinoid binding protein mRNA analysis by polymerase chain reaction*. Ophthalmic Paediatr Genet, 1993. **14**(3): p. 117-25.

91. Santagata, S., et al., *CRX is a diagnostic marker of retinal and pineal lineage tumors*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7932.
92. Laurent, V.E., et al., *Minimal disseminated disease in nonmetastatic retinoblastoma with high-risk pathologic features and association with disease-free survival*. JAMA Ophthalmology, 2016. **134**(12): p. 1374-1379.
93. Glubrecht, D.D., et al., *Differential CRX and OTX2 expression in human retina and retinoblastoma*. J Neurochem, 2009. **111**(1): p. 250-63.
94. Gonzalez-Fernandez, F., et al., *Expression of developmentally defined retinal phenotypes in the histogenesis of retinoblastoma*. The American Journal of Pathology, 1992. **141**(2): p. 363-375.
95. Boatright, J.H., et al., *Endogenous CRX expression and IRBP promoter activity in retinoblastoma cells*. Brain Res, 2001. **916**(1-2): p. 136-42.
96. Yamashita, N., et al., *Molecular detection of metastatic retinoblastoma cells by reverse transcription polymerase reaction for interphotoreceptor retinoid-binding protein mRNA*. Cancer, 2001. **91**(8): p. 1568-1573.
97. Berry, J.L., et al., *Potential of Aqueous Humor as a Surrogate Tumor Biopsy for Retinoblastoma*. JAMA Ophthalmol, 2017. **135**(11): p. 1221-1230.
98. Harbour, J.W., *Liquid Biopsy in Retinoblastoma*. JAMA Ophthalmol, 2017. **135**(11): p. 1231.
99. Afrin, S., et al., *Targeted Next-Generation Sequencing for Detecting MLL Gene Fusions in Leukemia*. Mol Cancer Res, 2017.
100. Porkholm, M., et al., *Molecular alterations in pediatric brainstem gliomas*. Pediatr Blood Cancer, 2018. **65**(1).
101. Li, Z., Y. Yin, and F. Liu, *Recent developments in predictive biomarkers of pediatric glioma*. Oncology Letters, 2017. **14**(1): p. 497-500.
102. Cao, Y., et al., *Clinical evaluation of integrated panel testing by next-generation sequencing for somatic mutations in neuroblastomas with MYCN unamplification*. Oncotarget, 2017. **8**(30): p. 49689-49701.
103. Johnson, L.M., et al., *Ethical considerations surrounding germline next-generation sequencing of children with cancer*. Expert Rev Mol Diagn, 2017. **17**(5): p. 523-534.
104. Lin, P.H., et al., *A targeted next-generation sequencing in the molecular risk stratification of adult acute myeloid leukemia: implications for clinical practice*. Cancer Med, 2017. **6**(2): p. 349-360.
105. Bick, D. and D. Dimmock, *Whole exome and whole genome sequencing*. Curr Opin Pediatr, 2011. **23**(6): p. 594-600.
106. Woo, J.S., M.O. Alberti, and C.A. Tirado, *Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update*. Experimental Hematology & Oncology, 2014. **3**: p. 16-16.
107. Silva, J.G., et al., *Clinical next generation sequencing of pediatric-type malignancies in adult patients identifies novel somatic aberrations*. Oncoscience, 2015. **2**(2): p. 187-92.
108. Kühlen, M. and A. Borkhardt, *Cancer susceptibility syndromes in children in the area of broad clinical use of massive parallel sequencing*. Eur J Pediatr, 2015. **174**(8): p. 987-97.

109. Subbiah, V., et al., *Clinical next-generation sequencing reveals aggressive cancer biology in adolescent and young adult patients*. *Oncoscience*, 2015. **2**(7): p. 646-58.
110. Ballester, L.Y., et al., *Integrating Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Children with Thyroid Lesions*. *Pediatr Dev Pathol*, 2016. **19**(2): p. 94-100.
111. Kurihara, S., et al., *Circulating free DNA as non-invasive diagnostic biomarker for childhood solid tumors*. *J Pediatr Surg*, 2015. **50**(12): p. 2094-7.
112. Picarsic, J.L., et al., *Molecular Characterization of Sporadic Pediatric Thyroid Carcinoma with the DNA/RNA ThyroSeq v2 Next-Generation Sequencing Assay*. *Pediatr Dev Pathol*, 2016. **19**(2): p. 115-22.
113. Grotta, S., et al., *Advantages of a next generation sequencing targeted approach for the molecular diagnosis of retinoblastoma*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 841.
114. Lasorsa, V.A., et al., *Exome and deep sequencing of clinically aggressive neuroblastoma reveal somatic mutations that affect key pathways involved in cancer progression*. *Oncotarget*, 2016. **7**(16): p. 21840-52.
115. Theruvath, J., et al., *Next-generation sequencing reveals germline mutations in an infant with synchronous occurrence of nephro- and neuroblastoma*. *Pediatr Hematol Oncol*, 2016. **33**(4): p. 264-75.
116. Singh, J., et al., *Next-generation sequencing-based method shows increased mutation detection sensitivity in an Indian retinoblastoma cohort*. *Mol Vis*, 2016. **22**: p. 1036-47.
117. Oliveira, I.D., et al., *TNF-alpha, TNF-beta, IL-6, IL-10, PECAM-1 and the MPO inflammatory gene polymorphisms in osteosarcoma*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2007. **29**(5): p. 293-7.
118. Furutani, E., C. Rodriguez-Galindo, and A.L. Green, *Early death in pediatric cancer: remaining questions and next steps*. *Oncotarget*, 2017. **8**(57): p. 96478-96479.