

Ana Glenda Santarosa Vieira

**ESTUDO DO POTENCIAL PAPEL DOS MICRORNAS COMO BIOMARCADORES DOS
TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DE OVÁRIO E TESTÍCULO NA INFÂNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Mariana Tomazini
Pinto

Barretos, SP

2021

Ana Glenda Santarosa Vieira

**ESTUDO DO POTENCIAL PAPEL DOS MICRORNAS COMO BIOMARCADORES DOS
TUMORES DE CÉLULAS GERMINATIVAS DE OVÁRIO E TESTÍCULO NA INFÂNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Mariana Tomazini
Pinto

Barretos, SP

2021

V657e Vieira, Ana Glenda Santarosa.

Estudo do potencial papel dos microRNA como biomarcadores dos tumores de células germinativas de ovário e testículo na infância. / Ana Glenda Santarosa Vieira. - Barretos, SP - 2021.

156 f. : il.

Orientador: Luiz Fernando Lopes.
Coorientadora: Mariana Tomazini Pinto.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

1. Tumor de células germinativas. 2. Biomarcadores. 3. microRNA. 4. Câncer infantil. 5. Testículo. 6. Ovário. I. Autor. II. Título.

CDD 618.92 994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570

Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Glenda Santarosa Vieira

Estudo do potencial papel dos microRNAs como biomarcadores dos tumores de células germinativas de ovário e testículo na infância

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 11/08/2021

Banca Examinadora:

Dra. Karla Emilia de Sá Rodrigues

Instituições: Universidade Federal de Minas Gerais / Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Carlos Alberto Scrideli

Instituições: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

Dr. Luiz Fernando Lopes

Orientador

Dra. Mariana Tomazini Pinto

Coorientadora

Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Presidente da Banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Ministério Público do Trabalho (MPT) e do Programa de Auxílio e Incentivo ao Pesquisador (PAIP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não refletem, necessariamente, a visão do MPT e do PAIP.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas, não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos. Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

Aos 11 anos de idade decidi que seguiria carreira acadêmica enquanto balançava meu sapatinho de verniz preto na cadeira de onde ouvia, maravilhada, minha mãe Terezinha defender o seu mestrado. Esta dissertação certamente é fruto do exemplo que recebi de você, minha mãe.

Ao meu pai Flávio Henrique, gratidão por insistir comigo, que o caminho do estudo era o melhor a seguir. Sabia que para fazê-lo orgulhoso de mim devia somente me fazer estudiosa.

Escutei logo no início desta caminhada que meu mestrado seria como um filho e, assim sendo, apresento-lhes Eduarda, Marcelinho e Beatriz, sua irmã caçula e agradeço por toda paciência e compreensão nos momentos de ausência, que nunca me foram protestados.

Meu querido Marcelo, marido lindo, determinado e habilidoso que, ao me amar, tornou-me capaz de alcançar qualquer objetivo e, sem saber, foi meu motivo para não desistir.

Ao Ser Supremo que chamo de Deus, mas poderia chamar de Alá, Brâman ou mesmo Buda: a fé me leva à ciência, mas a ciência jamais me afastará de Ti.

AGRADECIMENTOS

À **minha família** amada que pacientemente me assistiu durante esta jornada. Obrigada meu marido **Marcelo** por me transmitir calma e ao mesmo tempo garra e determinação durante meus momentos de desespero. Obrigada pela compreensão nos momentos de ausência (finais de semana, madrugadas da vida e feriados) e por cuidar dos nossos pequenos enquanto eu pipetava ou estudava. Minha filha **Duduca** que nunca me pediu atenção mesmo quando eu sabia que era isso de que ela precisava e que orquestrou com maestria a atenção aos seus irmãos, Marcelinho e Beatriz durante todos os domingos e feriados que me ausentei. Obrigada, minha filha, por entender sua mãe e por ser tão estudiosa e me encher de orgulho. Ao meu menininho amoroso e cheio de energia, **Marcelinho**, por sempre me receber em casa alegre pronto para brincar, nunca demonstrando a falta que eu fazia. Seu sorriso é um raio de sol que recarrega toda a minha bateria para seguir neste caminho longo. E obrigada, **Bibica**, a minha “galota”, minha caçula, minha galega, por ser tão carinhosa comigo e me fazer uma mãe completa. Vocês foram a fundação desta construção.

A **Deus**, Senhor de tudo e de todos, Aquele que me permitiu estar nesta vida, ser médica e pesquisadora. És quem me ouviu todo dia pela manhã (4 am) ao rezar e pedir sabedoria naquilo que me propunha a fazer. Não há sentido na vida se não acreditarmos que alguém ou alguma energia nos olha, protege e guia.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Fernando Lopes**, mente brilhante de infindável conhecimento e eterno soldado na grande batalha contra o câncer infantil. O senhor foi quem enxergou em mim o que nem eu mesma pude ver, me ensinou e confiou sua patologia do coração para que eu pudesse estudar e seguir seus passos.

À minha coorientadora **Prof^a. Dr^a. Mariana Tomazini Pinto**, menina de aparência e expertise de um ancião. Verdadeiro exemplo de pesquisadora com sua paciência inesgotável lapidou este estudo de forma brilhante. Com você enxerguei minha pequenez e também minha capacidade. Humildemente finalizei esta dissertação por você que nunca me reivindicou gratidão.

Aos membros assessores das bancas de acompanhamento e qualificação, **Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis** e **Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli**, que a cada encontro alternavam entre si críticas e entusiasmo, me motivando a cada etapa e me proporcionando momentos de introspecção que me fizeram crescer mais que em todos os anos de minha formação.

À minha querida **Thaíssa Maria Veiga Faria**, presente em qualquer dia e a qualquer hora em minha vida profissional. Dona de um coração gigante e um cérebro que não se esquece de nada. Você deve saber que foi responsável pela minha sanidade mental. Gratidão a toda **Equipe do Núcleo de Apoio ao Pesquisador (NAP) - Pediatria** em nome dela, de **Raniela Ferreira Faria** e **Diego da Silva Alves**.

Ao jovem **Eduardo Caetano Albino da Silva** que nunca mediu esforços para ver e rever minhas lâminas, sanar minhas dúvidas e me mostrar que nada na patologia é imutável. Sem você este estudo não teria se iniciado. Sem me esquecer das maravilhosas **Bia** e **Alexandra**, donas de sorrisos gentis, sempre dispostas a me ajudar.

Aos queridos **Ana Carolina Laus** e **André van Helvoort Lengert** do Centro de Pesquisa em oncologia Molecular (CPOM), professores natos no mais verdadeiro sentido da palavra. Incentivo, acreditação e paciência são os legados que levo de vocês, além de gratidão por me permitirem concretizar um sonho: pipetar!

Meus companheiros de infinitas análises, **Marco Antônio de Oliveira** e **Luciane Sussuchi da Silva**, obrigada pela paciência nas mais supérfluas dúvidas. Exemplos da *Teoria das Inteligências Múltiplas*, vocês são brilhantes!

À equipe do setor mais agradável para se estar, a biblioteca: **Milene Girio Marques do Nascimento** e **Martins Fideles dos Santos Neto**, eu já sinto saudades de encontrá-los às sextas-feiras. Obrigada pela disponibilidade e principalmente pelo bom humor de sempre, pois fizeram meu caminho ser leve.

À minha amiga **Bruna Minniti Mançano** em nome de todos os meus colegas da pós-graduação que riram comigo mesmo em momentos que tudo o que se esperava eram lágrimas de

desespero ao ouvir do dr. Ricardo Reis: “Nunca parem de escrever!”. Às vezes arranhar o sofá é necessário.

À minha companheira “TCGéte”, **Gisele Eiras Martins**, em nome de todos os meus **colegas de trabalho na Oncopediatria**, em especial às “tias”, que me formaram, e cada uma do seu jeito foram capazes de me motivar a estudar sempre mais para tornar-me digna de permanecer entre elas.

Ao **Hospital de Câncer de Barretos**, que me ensinou que nunca vou errar se tratar meus pacientes como se fossem um membro da minha família. À **pós-graduação** pela ajuda em cada etapa deste trabalho proporcionando meu título tão almejado de mestre. E ao **Ministério Público do Trabalho (MPT)** pelo auxílio financeiro para que este estudo fosse realizado.

Ao final e não menos importante, agradeço do fundo do meu coração aos **pacientes do Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos**, que depositam em mim o que têm de mais valor: sua saúde. Às **mães e pais** que colocam seus bens mais preciosos aos meus cuidados, acreditando no meu zelo e na minha competência. Poderia citar seus nomes e suas histórias sem esquecer de nem mesmo um, mas não teríamos folhas suficientes nesta dissertação. Este estudo é o início de um caminho sem volta por vocês e para vocês.

“Sempre acreditei em Sócrates quando ele dizia que nada sabemos. Mas não entendia o porquê de saber aquilo nos colocava em vantagem. Então voltei-me para a ciência e conheci grandes pensadores. Dentre eles Leonardo da Vinci que alertou que pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas e muito conhecimento, com que se sintam humildes. Assim lembrei-me de Deus, que me ensinou que se um dia eu quiser ser líder devo primeiro ser servo. Na vida, já dizia Marie Curie, não existe nada a temer, mas a entender. E se eu tiver mil ideias e somente uma acabar em trabalho, eu me sinto satisfeita.”

Sócrates; Leonardo da Vinci; São Marcos Evangelista; Marie Skłodowska-Curie; Alfred Bernhard Nobel

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia do câncer	1
1.2	Epidemiologia do câncer infantojuvenil (0 a 19 anos)	3
1.3	Tumor de células germinativas: aspectos gerais	6
1.4	Epidemiologia dos tumores de células germinativas (TCGs)	12
1.5	Marcadores biológicos dos TCGs	15
1.6	Estadiamento, estratificação de risco e tratamento	17
1.7	Alterações genéticas e epigenéticas dos TCGs	24
2	JUSTIFICATIVA	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Desenho e população do estudo	32
4.2	Critérios de elegibilidade	32
4.2.1	Critérios de exclusão	32
4.3	Aspectos éticos	32
4.4	Desenho do estudo e fluxo de atividade	33
4.5	Considerações estatísticas	34
4.5.1	Tamanho da amostra	34
4.5.2	Análises estatísticas	34
4.6	Extração e quantificação do RNA total em amostras de TCGs pediátricos	35
4.7	Análise da expressão dos miRNAs	36
4.8	Análise dos miRNAs diferencialmente expressos, processamento dos dados e controle de qualidade	38

5	RESULTADOS	42
5.1	Análise descritiva da população de estudo e características clínicas	42
5.2	Análise dos microRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de ovário e testículo	47
5.3	Intersecção das análises de tumores de ovário e testículo	52
5.4	Análise dos microRNAs diferencialmente expressos entre tecido tumoral e normal	55
5.5	Análise dos microRNAs diferencialmente expressos entre as amostras tumorais malignas	60
5.6	Intersecção das análises dos microRNAs diferencialmente expressos entre as amostras tumorais malignas	62
5.6.1	Análise de expressão dos microRNAs comuns entre os tipos histológicos seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário	65
5.7	Análise dos microRNAs diferencialmente expressos específico para cada tipo histológico dos TCGs	67
5.8	Relação da expressão dos microRNAs com as características clínicas	78
6	DISCUSSÃO	84
7	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	92
	ANEXOS	104
	Anexo A - Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa	104
	Anexo B – Ficha de coleta de dados do estudo	112
	Anexo C – Protocolo de extração de RNA de parafina	122

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa global do câncer como uma das principais causas de morte prematura entre indivíduos de 30 e 69 anos, indicando as classificações, com o número de países envolvidos entre parênteses. 1
- Figura 2** - Número de novos casos (A) e número de mortes por câncer (B) exceto câncer de pele não melanoma. 2
- Figura 3** - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto de pele não melanoma. 3
- Figura 4** - Distribuição global do câncer infantil. 4
- Figura 5** - A/B) Desenho ilustrativo da quarta semana do desenvolvimento embrionário. C) Visão lateral do embrião ilustrando local inicial da migração das células germinativas primordiais. 8
- Figura 6** - Histogênese e inter-relação de tumores ovarianos e testiculares de origem germinativa. 9
- Figura 7** - Desenvolvimento de linha germinativa e subtipos histológicos de tumores de células germinativas (TCGs). 10
- Figura 8** - Taxas de incidência de tumores em células germinativas, Grã-Bretanha 1962-1997. 13
- Figura 9** - Esquema terapêutico para tumor de células germinativas classificado como risco intermédio. 22

Figura 10 -	Esquema terapêutico para tumor de células germinativas classificado como alto risco.	23
Figura 11 -	Mecanismos distintos de regulação epigenéticas: A metilação do DNA, as modificações das histonas e a interferência da expressão gênica mediada pelo RNA, incluindo os microRNAs.	25
Figura 12 -	Biogênese dos miRNAs.	26
Figura 13 -	Fluxograma do projeto e atividades realizadas.	34
Figura 14 -	Fluxograma da análise de miRNAs pela tecnologia nCounter® (<i>NanoString Technologies</i>).	38
Figura 15 -	Demonstração Bloxpot das amostras de pacientes pediátricos com TCG gonadal submetidas a análise por <i>Nanostring</i> .	39
Figura 16 -	Boxplots referentes à normalização dos dados das contagens de miRNAs das amostras de tecido normal e tumoral. A) Boxplot antes da normalização; B) Boxplot após a normalização com o método <i>Quantile</i> .	40
Figura 17 -	Fluxo das amostras de pacientes pediátricos com TCGs gonadais incluídas no estudo.	43
Figura 18 -	Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras normais e tumorais de ovário. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do <i>cluster</i> .	48

- Figura 19** - Perfil de expressão dos miRNAs foi comparado entre as amostras normais e tumorais de testículo. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*. 51
- Figura 20** - Diagrama de Venn. Representação do número de miRNAs diferencialmente expressos entre as diferentes análises (Normal vs. Tumor de Testículo; Normal vs. Tumor de Ovário). O número intergráfico representa o número de miRNAs diferencialmente expressos em comum entre dois grupos. 53
- Figura 21** - *Volcano plot* da expressão dos miRNAs entre os grupos normais e tumorais, usando a tecnologia do painel *nCounter® miRNA Expression Assay*. A barra vertical representa o valor da expressão gênica (\log_2 fold change) e a barra horizontal a significância, inferior $P=0,05$ e superior $P=0,05$ ajustado. Os miRNAs que aparecem acima da linha horizontal e à esquerda vertical exibem baixa expressão (\log_2 fold change ≤ 2), os que aparecem acima da linha horizontal e à direita da linha vertical demonstram superexpressão (\log_2 fold change ≥ 2). O tamanho dos pontos dos miRNAs está relacionado com os valores de \log_2 fold changes. O gráfico é construído em logarítmico para que obtenha a forma apresentada. 56
- Figura 22** - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras normais e tumorais. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*. 58

- Figura 23 -** Análise de *t-distributed Stochastic Neighborhood Embedding* (t-SNE) para determinar as amostras normais *versus* tumorais. Os pontos em amarelo indicam as amostras de disgerminoma, pontos vermelhos, o carcinoma embrionário, pontos em roxo, o seio endodérmico, pontos em lilás, teratoma maduro, pontos azuis, o teratoma imaturo e pontos verdes, amostras normais. 60
- Figura 24 -** Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras tumorais malignas, incluindo carcinoma embrionário, disgerminoma, seio endodérmico e teratoma imaturo. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*. 61
- Figura 25 -** Diagrama de Venn. Representação do número de miRNAs diferencialmente expressos entre as diferentes análises (Normal vs. carcinoma embrionário; Normal vs. disgerminoma; Normal vs. seio endodérmico e Normal vs. teratoma imaturo). O número intergráfico representa o número de miRNAs diferencialmente expressos em comum entre os grupos. 63
- Figura 26 -** Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de tumor de seio endodérmico e amostras-controle. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*. 68
- Figura 27 -** Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de disgerminoma e amostras-controle. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas

pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*. 71

Figura 28 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de carcinoma embrionário e amostras-controle. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do *cluster* é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*. 74

Figura 29 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de teratoma imaturo e amostras-controle. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do *cluster* é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*. 76

Figura 30 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de teratoma maduro e amostras-controle. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do *cluster* é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*. 77

Figura 31 - miRNAs mais diferencialmente expressos e específicos para cada tipo histológico, dados do estudo. 78

Figura 32 - Comparação da expressão dos miRNAs hsa-miR-302a-3p (A), hsa-miR-302b-3p (B), hsa- hsa-miR-367-3p (C), hsa-miR-371a-5p (D), hsa-miR-372-3p (E), e hsa-miR-373-3p (F) nos diferentes tipos histológicos. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estimativas para o ano de 2020 das taxas brutas de incidência de câncer por 1 milhão de crianças e adolescentes (0-19 anos) e do número de casos novos de câncer, segundo o sexo.	5
Tabela 2 -	Classificação histológica dos TCGs pela OMS/WHO 2016 ²² .	11
Tabela 3 -	Distribuição de frequência e porcentagem dos pacientes com tumores de células germinativas (TCGs) cadastrados nos protocolos brasileiros já publicados.	14
Tabela 4 -	Marcadores tumorais encontrados em TCGs.	16
Tabela 5 -	Estratificação de risco para TCG ovariano.	19
Tabela 6 -	Estadiamento de TCG testicular.	19
Tabela 7 -	Estratificação de risco para TCG testicular.	20
Tabela 8 -	Características dos pacientes com TCG gonadal. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).	44
Tabela 9 -	Marcadores tumorais séricos dos pacientes com TCG gonadal. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).	46
Tabela 10 -	Lista dos top 10 miRNAs mais e menos expressos nas amostras de tecido tumoral de ovário comparado com tecido normal. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).	49

Tabela 11 -	Lista dos top 10 miRNAs mais e menos expressos nas amostras de tecido tumoral de testículo comparado com tecido normal. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).	52
Tabela 12 -	Lista dos 31 miRNAs diferencialmente expressos em comum entre os tumores de testículo e ovário, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).	54
Tabela 13 -	Lista dos 20 miRNAs diferencialmente expressos nos tumores de testículo e 18 miRNAs nos ovários comparados com tecido normal, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).	55
Tabela 14 -	Lista dos 10 miRNAs diferencialmente expressos em comum entre todos os tumores malignos carcinoma embrionário, disgerminoma, seio endodérmico e teratoma imaturo, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).	64
Tabela 15-	Lista dos 26 miRNAs diferencialmente expressos em comum entre os tumores de seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).	66
Tabela 16 -	Lista dos 25 miRNAs diferencialmente expressos exclusivamente em tumores de seio endodérmico, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).	69

- Tabela 17 -** Lista dos 34 miRNAs diferencialmente expressos exclusivamente em disgerminomas, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos). 73
- Tabela 18 -** Lista dos 13 miRNAs diferencialmente expressos exclusivamente em carcinoma embrionário, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos). 75
- Tabela 19 -** Relação dos 26 miRNAs que foram diferencialmente expressos em comum entre os tipos histológicos disgerminoma, seio endodérmico e carcinoma embrionário. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos). 79
- Tabela 20 A -** Relação das características clínicas dos pacientes TCGs com os miRNAs diferencialmente expressos em comum nos tumores de seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos). 80
- Tabela 20 B -** Relação das características clínicas dos pacientes TCGs com os miRNAs diferencialmente expressos em comum nos tumores de seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos). 81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistema de estadiamento do câncer de ovário, trompa de falópio e peritoneal correspondente FIGO, 2014.

17

LISTA DE ABREVIATURAS

AFP	Alfafetoproteína
AMOs	Oligonucleotídeos anti-miRNA
AUC	Área sob a curva
BHCG	Fração beta da gonadotrofina coriônica
CCG	<i>Children's Cancer Group</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CNV	Variação no número de cópias de segmentos de DNA
DANT	Doenças e agravos não transmissíveis
DHL	Desidrogenase láctica
DP	Desvio padrão
EUA	Estados Unidos da América
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GCNIS	Neoplasia de células germinativas <i>in situ</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
MaGIC	<i>Malignant Germ Cell International Colaboration</i>
miRNA	microRNA
miRNAs	microRNAs
MMGCT	Tumor de células germinativas malignas mistas
nCounter®	<i>NanoString Technologies</i>
NEB	Núcleo de Estatística e Bioinformática
OMS	Organização Mundial da Saúde
POG	<i>Pediatric Oncology Group</i>
RedCap	<i>Research Electronic Data Capture</i>
RISC	Complexo de silenciamento induzido de RNA
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>

SisOnco	Sistema <i>online</i> do Hospital de Câncer de Barretos
SNC	Sistema nervoso central
SP	São Paulo
t-SNE	<i>t-distributed Stochastic Neighborhood Embedding</i>
TCG	Tumor de célula germinativa
TCGs	Tumores de células germinativas
TCGT	Tumores de células germinativas testiculares
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
WHO	<i>World Health Organization</i>
X/S	<i>Extensible style language</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
=	Igual
>	Maior
≥	Maior igual
+	Mais ou positivo
<	Menor
≤	Menor igual
-	Menos ou negativo
μl	Microlitro
ml	Mililitro
ng/dl	Nanogramas por decilitro
n ^o	Número
%	Porcentagem
rpm	Rotações por minuto
p	Valor de p
vs	<i>Versus</i>

RESUMO

Vieira AGS. *Estudo do potencial papel dos microRNAs como biomarcadores dos tumores de células germinativas de ovário e testículo na infância. Dissertação (Mestrado)*. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2021.

JUSTIFICATIVA: Os Tumores de Células Germinativas (TCGs) são neoplasias benignas ou malignas e podem apresentar diferentes tipos histológicos, de acordo com o grau de diferenciação celular. Derivados de células germinativas primordiais, podem ocorrer em sítios gonadais e extragonadais e acometer indivíduos de qualquer faixa etária. Os principais marcadores biológicos dos TCGs são alfafetoproteína (AFP) e a fração beta da gonadotrofina coriônica (BHCG). Entretanto, não há até o momento nenhum marcador molecular específico para o diagnóstico/prognóstico dos TCGs pediátricos, sendo relevante a avaliação da expressão dos microRNAs (miRNAs). **OBJETIVO:** Avaliar a expressão dos miRNAs em tumores de células germinativas de ovário e testículo pediátricos e relacioná-los com os dados clínico-patológicos de pacientes do Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Estudo de coorte retrospectiva em que foi avaliada a expressão de miRNAs em amostras de TCGs de ovário e testículo, condicionadas em blocos de parafina, provenientes de pacientes, com idade de 0 a 18 anos, tratado pelos Protocolos Brasileiros de TCG 99 e 2008 no Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos entre o período de janeiro de 2000 a dezembro de 2017. **RESULTADOS:** Foram avaliadas 11 amostras de testículos e 31 de ovário com diferentes histologias, incluindo teratomas, tumor de seio endodérmico, carcinoma embrionário e disgerminoma. Ainda, como controle, foram utilizadas cinco amostras de tecido normal adjacente de testículo e cinco de ovário. A média de idade encontrada foi de 11,8 anos, sendo 14 anos nas meninas e 5 anos em meninos. Dentre os pacientes com envolvimento ovariano o disgerminoma foi a histologia mais frequente e tumor de seio endodérmico nos pacientes com envolvimento testicular. A expressão dos miRNAs foi avaliada por meio da plataforma NanoString usando o painel *Human v3 miRNA Assay CSO* e os dados foram analisados utilizando a ferramenta R/Bioconductor. Nas análises comparando tecido normal com tecido tumoral de ovário e testículo foi observado um dendrograma com dois agrupamentos distintos, separando as amostras de tecido normal e teratoma maduro e

imaturu das amostras de tecido tumoral com componente histológico maligno (seio endodérmico, carcinoma embrionário e disgerminoma). Doze miRNAs foram superexpressos em comum em amostras testiculares e ovarianas comparadas com as amostras controle-normal, sendo eles: hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-200b-3p e hsa-miR-371a-5p. Dentre os miRNAs menos expressos, destacam-se o hsa-miR-509-3p, hsa-miR-513b/c-3p e hsa-miR-514a-3p. Esses miRNAs podem ser utilizados como biomarcadores para auxiliar no diagnóstico dos pacientes com TCGs de ovário e testículo. Na análise comparativa entre os tumores malignos, foram identificados seis miRNAs superexpressos (hsa-miR-371a-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-302a-3p e hsa-miR-302b-3p), sendo que o hsa-miR-302b-3p foi o único que apresentou associação significativa com as características clínicas relacionadas ao risco, metástase, marcador AFP pré-cirurgia, recidiva e status. Por fim, foi identificado uma assinatura de miRNAs específicos para cada histologia de TCGs, sendo os mais significativos: i) Carcinoma embrionário: hsa-miR-1323, hsa-miR28-5p, hsa-miR24-3p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-500a-5p+501-5p; ii) Seio endodérmico: hsa-miR-122-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-302a-5p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-141-3p; iii) Disgerminoma: hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-223-3p; iv) Teratoma Imaturo: hsa-miR-199b-5p.

CONCLUSÃO: O potencial destas moléculas como biomarcadores de TCGs deverá ser melhor explorado, uma vez que poderão auxiliar no diagnóstico precoce, predição de prognóstico e monitoramento do tratamento do tumor e, conseqüentemente um melhor direcionamento terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE: Tumor de Células Germinativas; Biomarcadores; microRNA; Câncer Infantil; Testículo; Ovário.

ABSTRACT

Vieira AGS. *Study of the potential role of microRNAs as biomarkers of ovarian and testicular germ cell tumors in childhood*. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2021.

BACKGROUND: Germ Cell Tumors (GCTs) are benign or malignant neoplasms and may present different histological types, according to the degree of cell differentiation. Derived from primordial germ cells, they can occur in gonadal and extragonadal sites and affect individuals of any age group. The main biological markers of GCTs are alpha-fetoprotein (AFP) and the beta fraction of chorionic gonadotropin (BHCG). However, so far there is no specific molecular marker for the diagnosis/prognosis of pediatric GCTs, and the evaluation of the expression of microRNAs (miRNAs) is relevant. **AIM:** To evaluate the expression of miRNAs in pediatric ovarian and testicular germ cell tumors and relate them to clinicopathological data from patients at the Barretos Cancer Hospital. **MATERIALS AND METHODS:** Retrospective cohort study evaluating the expression of miRNAs in samples of GCTs of ovary and testis, conditioned in paraffin blocks, from patients, aged 0 to 18 years, treated by the GCT Brazilian Protocols 99 and 2008 at the Barretos Cancer Hospital between January 2000 and December 2017. **RESULTS:** Eleven testicular and 31 ovarian samples with different histology were evaluated, including teratomas, endodermal sinus tumor, embryonic carcinoma and dysgerminoma. Still, as a control, five samples of adjacent normal tissue from the testis and five from the ovary were used. The mean age found was 11.8 years, with 14 years for girls and 5 years for boys. Among patients with ovarian involvement, dysgerminoma was the most frequent histology and endodermal sinus tumor in patients with testicular involvement. The expression of miRNAs was evaluated using the NanoString platform using the Human v3 miRNA Assay CSO panel and the data were analyzed using the R/Bioconductor tool. In the analyzes comparing normal tissue with tumor tissue of the ovary and testis, a dendrogram with two distinct groups was observed, separating the samples of normal tissue and mature and immature teratoma from tumor tissue samples with a malignant histological component (endodermal sinus, embryonic carcinoma and dysgerminoma). Twelve miRNAs were overexpressed in common in testicular and ovarian samples compared to normal-control samples, namely: hsa-miR-302d-

3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-141- 3p, hsa-miR-200b-3p and hsa-miR-371a-5p. Among the less expressed miRNAs, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-513b/c-3p and hsa-miR-514a-3p stand out. These miRNAs can be used as biomarkers to aid in the diagnosis of patients with testicular and ovarian GCTs. In the comparative analysis between malignant tumors, six overexpressed miRNAs were identified (hsa-miR-371a-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-302a-3p and hsa-miR-302b-3p), and hsa-miR-302b-3p was the only one that showed a significant association with clinical characteristics related to risk, metastasis, pre-surgery AFP marker, recurrence and status. Finally, a signature of specific miRNAs was identified for each histology of GCTs, the most significant being: i) Embryonic carcinoma: hsa-miR-1323, hsa-miR28-5p, hsa-miR24-3p, hsa-miR-361- 3p, hsa-miR-500a-5p+501-5p; ii) Endodermal sinus: hsa-miR-122-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-302a-5p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-141-3p; iii) Dysgerminoma: hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-223-3p; iv) Immature Teratoma: hsa-miR-199b-5p.

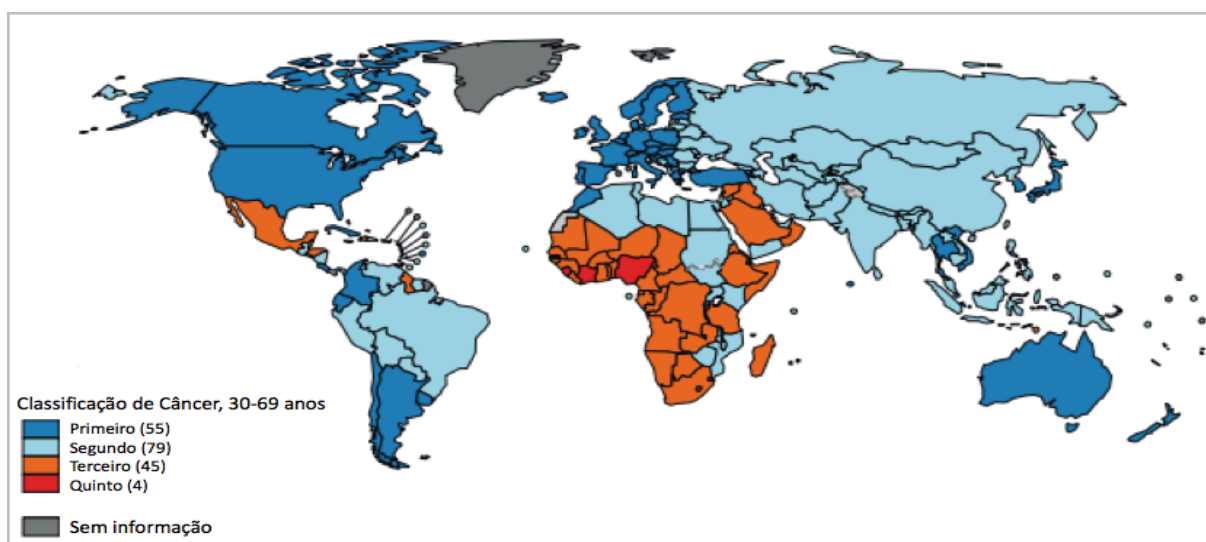
CONCLUSION: The potential of these molecules as GCT biomarkers should be further explored, as they may help in early diagnosis, prognosis prediction and monitoring of tumor treatment, and consequently a better therapeutic targeting.

KEYWORDS: Germ Cell Tumor; Biomarkers; microRNA; Childhood Cancer; Testicle; Ovary.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer

O câncer é incluído dentre as doenças e agravos não transmissíveis (DANT) e é considerado o principal problema de saúde pública no mundo¹ e no Brasil assim como em muitos países do leste europeu. É a segunda principal causa de morte entre 30 e 69 anos, chamada de morte prematura, perdendo somente para doenças cardiovasculares. Em países como o Canadá, Estados Unidos, bem como na América do Sul e na maioria dos países da Europa o câncer é a principal causa de morte prematura (**Figura 1**)².



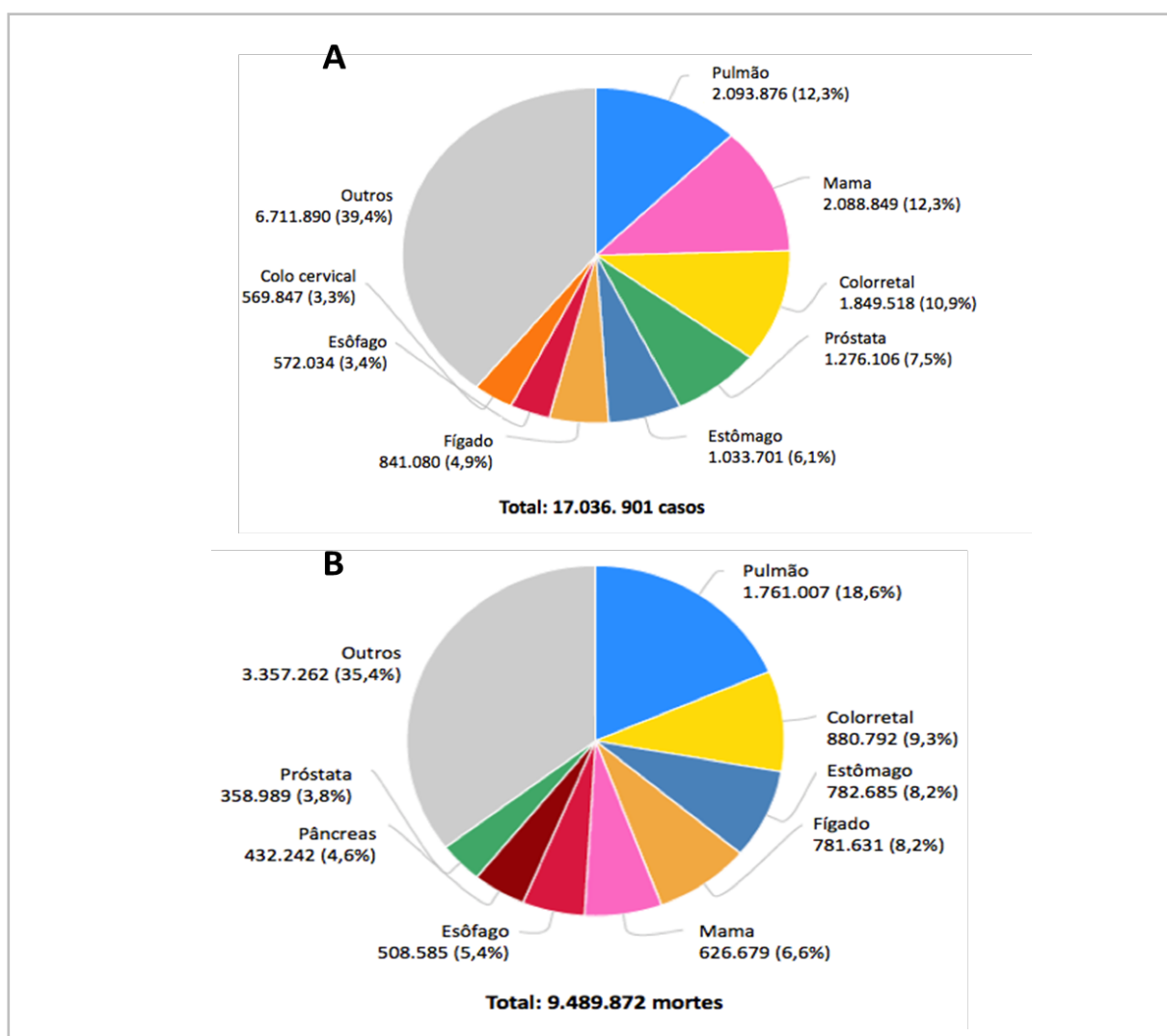
Fonte: Wild et al.²

Figura 1 - Mapa global do câncer como uma das principais causas de morte prematura entre indivíduos de 30 e 69 anos, indicando as classificações, com o número de países envolvidos entre parênteses.

Os padrões e tendências na mortalidade em relação ao câncer variam acentuadamente entre os países devido às diferenças de estilos de vida, tipos de dieta e exposições locais a fatores de risco que ainda diferem de acordo com Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) de cada nação². Há um acréscimo na incidência e na mortalidade por câncer atrelada ao envelhecimento e crescimento populacional, aos fatores de risco para câncer e desenvolvimento socioeconômico de cada país¹.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) propõe objetivos inquestionáveis para o enfrentamento do câncer, incluindo: i) prevenir o que for prevenível; ii) curar o que for curável; iii) alívio da dor e melhoria da qualidade de vida; iv) gestão para o sucesso³. Dessa forma, estratégias para o diagnóstico precoce e tratamento correto de tumores é parte fundamental para alcançar um manejo de excelência.



O projeto Globocan, da *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, mostrou que, em 2018, ocorreram mais de 17 milhões de casos novos de câncer e mais de 9 milhões de óbitos por câncer de um modo geral⁴ (**Figura 2**). Um em cada oito homens e uma em cada 10 mulheres provavelmente desenvolverão a doença durante a vida².



Fonte: Wild et al.²

Figura 2 - Número de novos casos (A) e número de mortes por câncer (B) exceto câncer de pele não melanoma.

No âmbito brasileiro, estima-se que de 2020 a 2022 ocorrerão 450 mil casos novos de câncer a cada ano, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma com 177 mil casos, seguido por 66 mil casos de cânceres de mama, 66 mil de próstata, 41 mil de câncer de cólon e reto, 30 mil de pulmão e 21 mil casos de câncer de estômago (**Figura 3**)¹.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%		
Próstata	65.840	29,2%	Homens		Mama feminina	66.280	29,7%		
Cólon e reto	20.520	9,1%			Mulheres		Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero		16.590	7,4%	
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão		12.440	5,6%	
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide		11.950	5,4%	
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago		7.870	3,5%	
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário		6.650	3,0%	
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero		6.540	2,9%	
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin		5.450	2,4%	
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central		5.220	2,3%	

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA¹

Figura 3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto de pele não melanoma.

De modo geral, as maiores taxas de incidência foram observadas nos países desenvolvidos, onde predominam os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto). Nos países de baixo e médio desenvolvimento, ainda é alta a ocorrência de tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago e fígado). O perfil de incidência de câncer no Brasil é semelhante ao perfil de países desenvolvidos, porém ainda existem no país altas taxas de cânceres relacionados a infecções, característica de um país em desenvolvimento³. Entretanto, para muitos tipos de câncer, as taxas de mortalidade ainda estão aumentando, ou na melhor das hipóteses, estabilizando².

1.2 Epidemiologia do câncer infantojuvenil (0 a 19 anos)

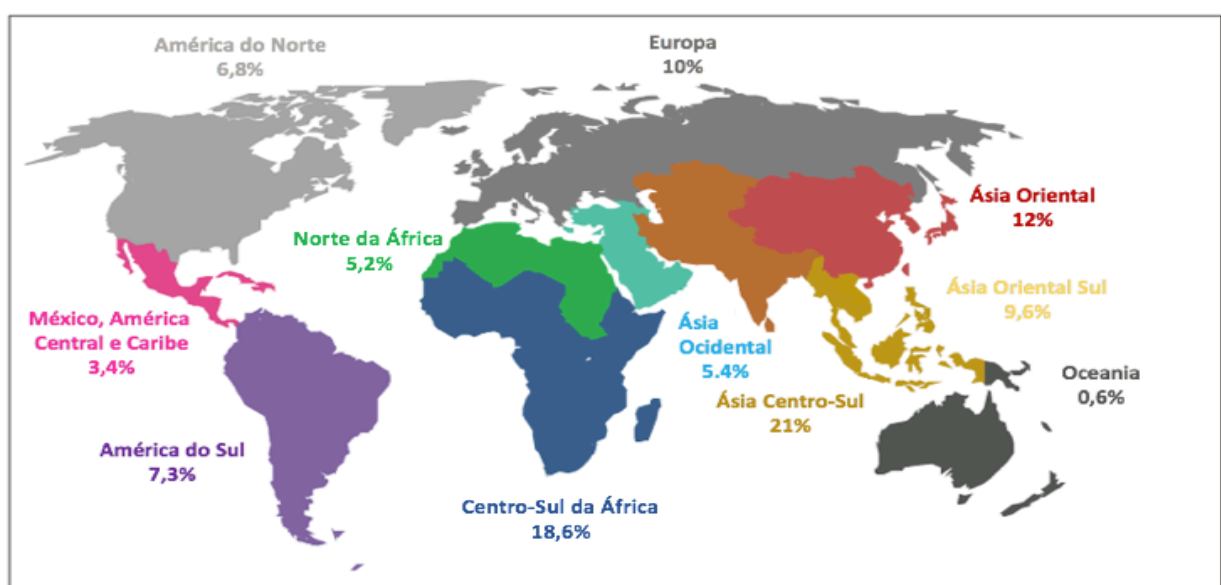
Diferente do câncer em adulto cuja incidência se divide por região anatômica em que aparece a doença, o câncer infantojuvenil é subdividido e analisado pelo tipo histológico.

Ainda, os fatores de risco relacionados com o desenvolvimento do câncer em adultos não têm relação com o desenvolvimento do câncer em criança ou adolescente. Embora mais estudos sejam necessários, pode-se afirmar que a exposição à radiação e o tabagismo passivo aumentam o risco para desenvolvimento de câncer¹.

O câncer infantil tem predomínio embrionário, sendo assim, células de sustentação tecidual e do sistema sanguíneo são as comumente afetadas. Embora raro, alterações genéticas numa criança pode torná-la propensa ao câncer¹. Nas últimas quatro décadas, o progresso no tratamento do câncer na infância e na adolescência foi extremamente significativo. Atualmente, aproximadamente 80% das crianças e adolescentes com câncer podem ser curados, se diagnosticados precocemente e tratados em centros especializados, sendo que a maioria terá boa qualidade de vida após o tratamento adequado¹.

O câncer em crianças e adolescentes é considerado raro quando comparado com o câncer em adultos. Considerando todos os tumores malignos na população, o câncer infantil corresponde a 1 a 4% de todos os tumores^{1, 3}. Porém, a incidência global de câncer infantil está aumentando¹. Na Austrália, aproximadamente 1.000 jovens entre 15 e 25 anos são diagnosticados com câncer anualmente⁵ e, globalmente, o número de novos casos de câncer em todas as faixas etárias aumentará de 12,7 milhões em 2008, para 22,2 milhões em 2030⁶.

A **Figura 4** mostra um mapa com a distribuição global do câncer infantil por região destacada⁶.



Fonte: Rodriguez-Galindo et al.⁶

Figura 4 - Distribuição global do câncer infantil.

Ward e colaboradores⁷ criaram um modelo para simular a incidência de câncer infantil em 200 países, com dados epidemiológicos consistentes. Em 2015, 224.000 casos de câncer infantil foram diagnosticados, entretanto foi estimado que houve um total de 397.000 casos. Assim, 173.000 casos (43%) não foram diagnosticados globalmente, variando de 3% na Europa Ocidental e na América do Norte a 57% na África Ocidental. No sul da Ásia (incluindo o sudeste da Ásia e a região centro-sul da Ásia), a proporção geral de casos não diagnosticados foi estimada em 49%. Por fim, levando em consideração as projeções populacionais, estima-se que haverá 6,7 milhões de casos de câncer na infância em todo o mundo entre 2015 e 2030. Infelizmente, 2,9 milhões de casos de câncer infantil serão esquecidos entre 2015 e 2030⁷.

O número de casos novos de câncer infantojuvenis esperados para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 4.310 casos novos no sexo masculino e de 4.150 para o sexo feminino (**Tabela 1**). Esses valores correspondem a um risco estimado de 137,87 casos novos por milhão no sexo masculino e de 139,04 por milhão para o sexo feminino¹.

Tabela 1 - Estimativas para o ano de 2020 das taxas brutas de incidência de câncer por 1 milhão de crianças e adolescentes (0-19 anos) e do número de casos novos de câncer, segundo o sexo.

Estimativa dos Casos Novos						
Regiões do Brasil	Feminino		Masculino		Total	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Norte	270	85,89	360	101,19	630	93,71
Nordeste	1,040	114,30	1,150	121,70	2,190	118,07
Centro-Oeste	350	149,26	290	121,69	640	135,18
Sudeste	1,820	160,51	1,870	158,15	3,690	159,30
Sul	670	173,55	640	157,35	1,310	165,27
Brasil	4,150	139,04	4,310	137,87	8,460	138,44

Fonte: INCA¹

Entre os tipos de câncer infantojuvenil em todo o mundo, a leucemia é o mais comum na maioria das populações (25 a 35%). Leucemias, linfomas e tumores do sistema nervoso central (SNC) são os mais comuns diferindo entre segundo e terceiro lugares. Em países desenvolvidos, tumores do SNC correspondem ao segundo tipo de câncer mais comum. Já nos países em desenvolvimento, linfoma é o segundo mais incidente^{1, 3, 8}. Os tumores do sistema nervoso central representam 8 a 15% dos cânceres, sendo o tumor sólido mais frequente na faixa etária pediátrica⁹. Os tumores embrionários, como retinoblastoma, neuroblastoma e nefroblastoma (tumor de Wilms) são responsáveis por cerca de 20% de todos os tumores infantojuvenis e raramente ocorrem em outra faixa etária. Os carcinomas representam menos de 5% dos tumores na infância, sendo o tipo mais frequente nos adultos^{1, 3, 8}.

As neoplasias que ocorrem em crianças menores de 1 ano diferem do ponto de vista clínico e biológico, daquelas que acometem as crianças maiores de um ano e representam 10% de todas as neoplasias diagnosticadas em menores de 14 anos. Em geral, são mais incidentes no sexo masculino, exceto para as leucemias. O tumor mais frequente no mundo nesta faixa etária é o neuroblastoma, seguido das leucemias agudas, dos tumores de SNC e do retinoblastoma^{1, 3}.

Apesar de existirem variações regionais, globalmente a porcentagem de crianças que morrem antes dos 5 anos de idade diminuiu de 250 por 1000 nascidos vivos a menos de 70 nos últimos 50 anos¹⁰.

A mortalidade por câncer em crianças e adolescentes possui padrões geográficos diferentes³. Entretanto, em todo Brasil, assim como em países desenvolvidos, o câncer é a primeira causa de morte por doença e, dentre todas as causas de morte, fica atrás somente de causas externas^{1, 11}. Em 2017, ocorreram, para o sexo masculino, 1.467 óbitos por câncer infantojuvenil para todas as neoplasias, com um risco estimado de 44,46/milhão. No sexo feminino, houve 1.086 óbitos, com um risco estimado de 34,30/milhão¹.

1.3 Tumor de células germinativas: aspectos gerais

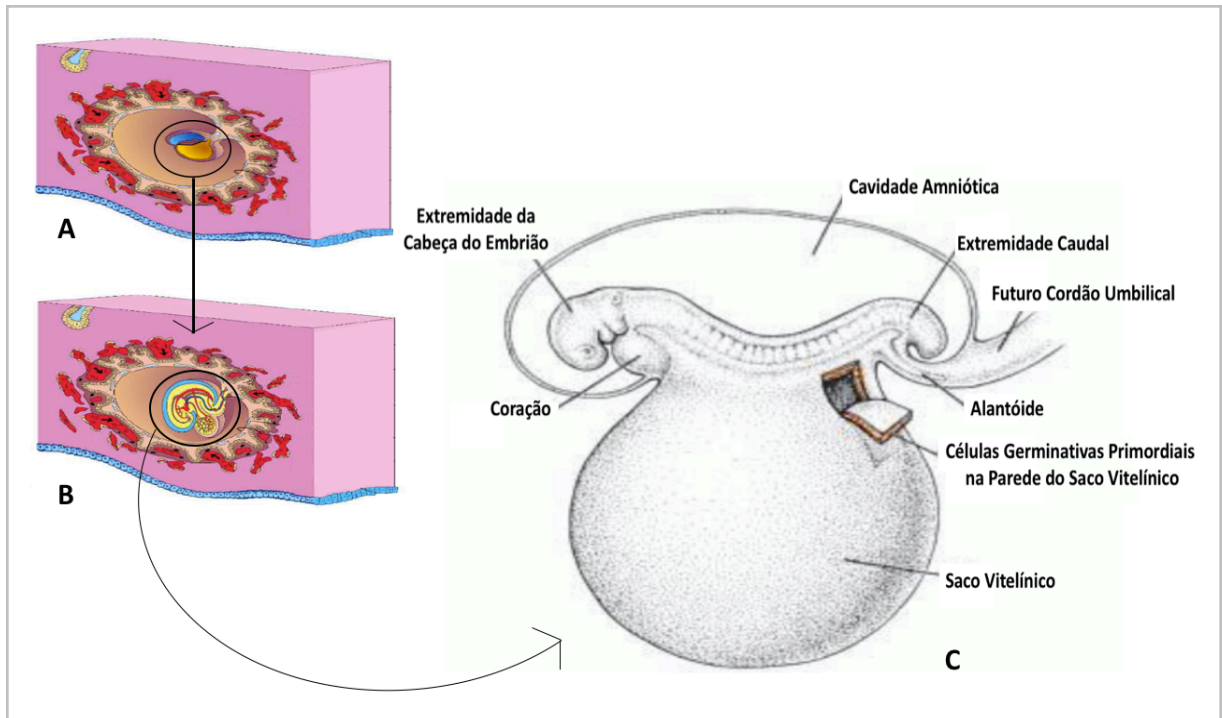
Os tumores de células germinativas (TCGs) são caracterizados como neoplasias benignas ou malignas derivados de células germinativas primordiais e que podem ocorrer em sítios gonadais (ovário e testículo) e extragonadais (mediastino, região sacrococcígea, sistema nervoso central, retroperitônio, vagina, coração, fígado, etc). Seu diagnóstico agrupa uma

variedade de neoplasias que diferem significativamente em relação à sua apresentação clínica, histologia e biologia¹².

O processo de desenvolvimento embrionário se inicia na fecundação seguida da segmentação holoblástica ou também conhecida como clivagem que dá origem ao blastocisto que comporta duas camadas de células, o trofoblasto que darão origem aos anexos embrionários e o embrioblasto, até a nidação que é o momento em que o blastocisto se implanta na parede uterina. Seguindo a organogênese, a gastrulação é o primeiro momento em que pode individualizar folhetos embrionários ou germinativos (a endoderme, que se diferencia na mesoderme e a ectoderme). Até a quarta semana embrionária acontece a adição, proliferação e migração de células germinativas através da linha primitiva em sua extremidade caudal no plano dorsal do disco embrionário até sua extremidade cranial onde se forma o nó primitivo, a lateralidade do embrião a ser formado (**Figura 5**).

Pouco depois do aparecimento desta linha primitiva, as células abandonam sua superfície profunda e formam o mesoblasto, uma rede frouxa de tecido conjuntivo conhecido como mesênquima, que forma o tecido de sustentação do embrião. Concomitantemente a formação da linha primitiva acontece uma invaginação desta linha formando um sulco que dá origem à notocorda, que define o eixo craniocaudal, sendo a base para desenvolvimento axial do embrião. Este processo é também conhecido como neurulação e, nesta etapa, a ectoderme origina epiderme e seus anexos, olhos e sistema nervoso, a mesoderme origina músculos, sistema circulatório e cartilagens e ossos e a endoderme origina fígado, pâncreas, sistema respiratório e revestimento do tubo digestório¹³.

Após a chegada à gônada nascente, as células germinativas primordiais devem iniciar a transição de células pluripotentes migratórias para os espermatozoides ou progenitores de óvulos. Este processo é controlado por expressão gênica específica para determinação do sexo e a interrupção desses mecanismos de diferenciação representa possível vulnerabilidade ao desenvolvimento de TCGs pediátricos gonadais¹⁴.



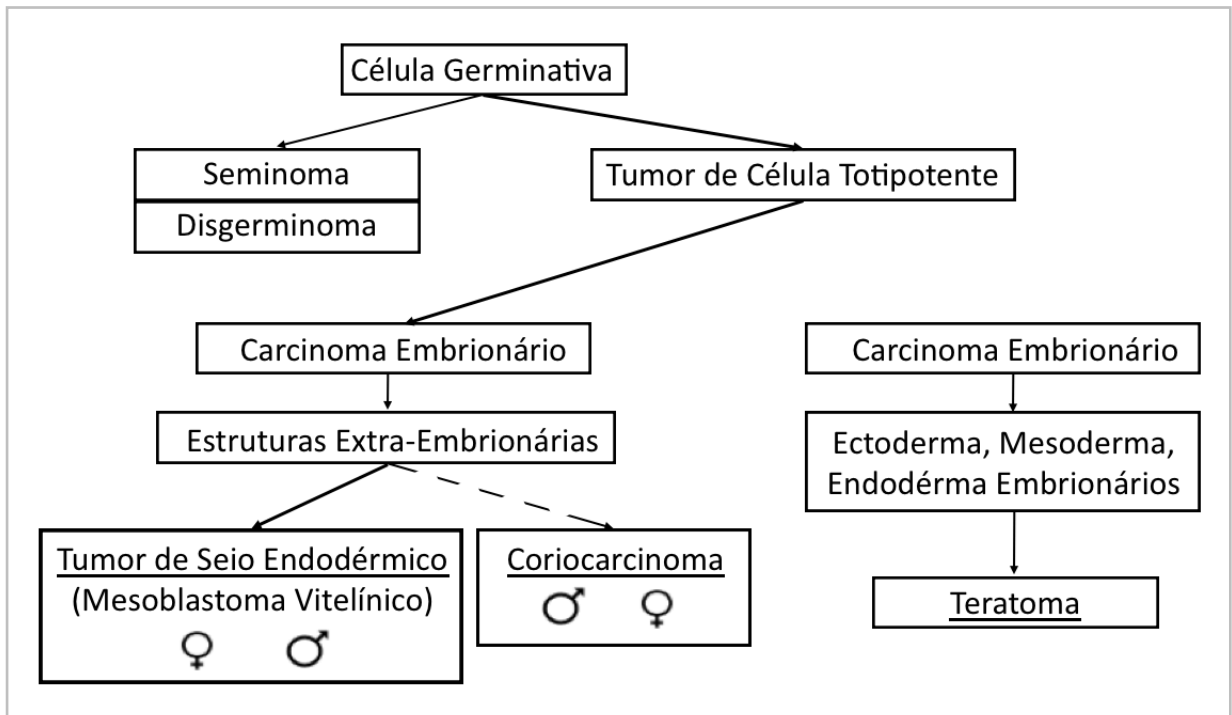
Fonte: Adaptado de A/B) Moore¹³ e C) *Primordial Germ Cells*¹⁵

Figura 5 – A/B) Desenho ilustrativo da quarta semana do desenvolvimento embrionário. C) Visão lateral do embrião ilustrando local inicial da migração das células germinativas primordiais.

Por razões ainda não conhecidas, restos da linha primitiva podem persistir e dar origem a tumores em áreas extragonadais, ou seja, sacrococcígeos, retroperitoniais, mediastinais, cervicais ou cerebrais^{13, 16}. O rompimento desse processo de migração provavelmente explica a ocorrência de tumores extragonadais de células germinativas e sua propensão à linha média¹⁷. Dessa forma, os tumores podem apresentar localização gonadal ou extragonadal e, como a transformação maligna pode ocorrer em vários níveis da histogênese, com a célula germinativa já diferenciada ou ainda pluripotente, os TCGs também podem ser de vários tipos histológicos, de acordo com o grau de diferenciação celular¹⁸.

Em 1907, Askanazy foi o primeiro médico a propor que uma célula totipotente indiferenciada poderia sofrer metamorfose e produzir os teratomas^{16, 19}. Após cinquenta e oito anos, Teilum propõe um modelo hipotético de tumorigênese postulando que germinomas (seminomas em sítios testiculares e disgerminomas em sítios ovarianos) surgem

diretamente de células germinativas primordiais não diferenciadas e, portanto, mantêm sua pluripotência (Figura 6)²⁰.



Fonte: Adaptado de Teilum²⁰

Figura 6 - Histogênese e inter-relação de tumores ovarianos e testiculares de origem germinativa.

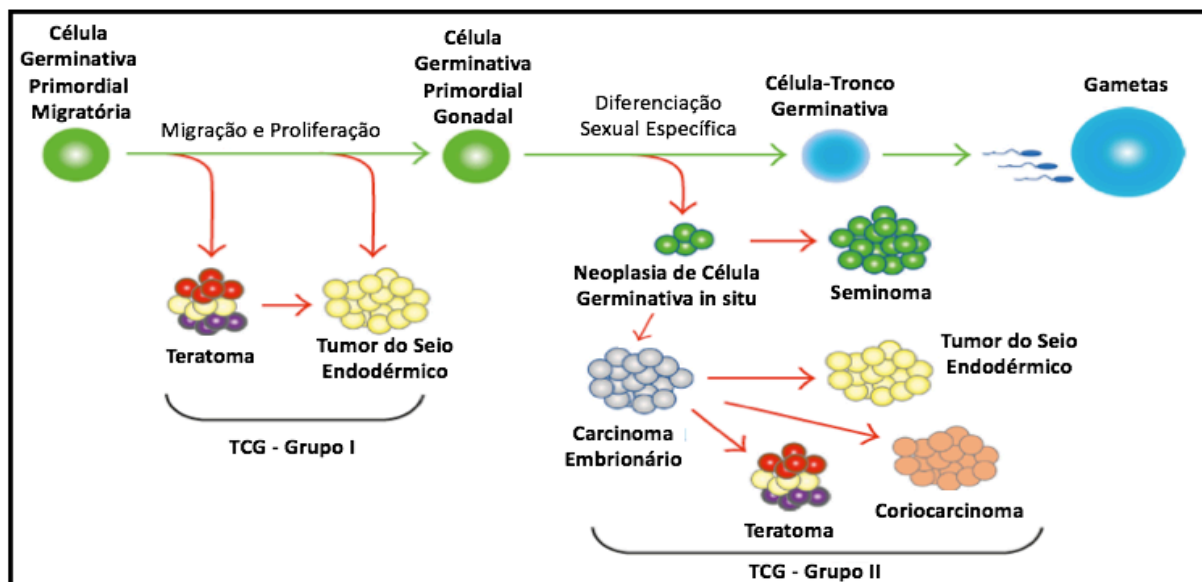
Nesta classificação, o termo "carcinoma embrionário" é restrito a tumores compostos por células embrionárias neoplásicas indiferenciadas, representando a forma indiferenciada de tipos extra-embrionários e embrionários.

Postula-se que os TCGs podem ser classificados em dois principais tipos histológicos, conhecidos como seminomatosos e não-seminomatosos, TCGs seminomatosos são tumores constituídos por células germinativas indiferenciadas que podem histologicamente se assemelhar a espermatogônia e oogônia jovem ou mesmo células germinativas de linhagens de desenvolvimento. Quando presentes no testículo são chamados seminoma, disgerminoma no ovário e germinoma quando são encontrados em sítio extragonadal. TCGs não seminomatosos são subdivididos em carcinoma embrionário que se assemelha histologicamente ao blastocisto, tumor do saco vitelino ou também chamado de tumor de seio endodérmico têm uma morfologia endodérmica complexa com componentes

endodérmicos embrionário e extraembrionário, teratoma maduro que histologicamente apresenta-se como uma mistura desordenada de tipos celulares diferenciados e teratoma imaturo quando apresentam uma diferenciação neural única, e coriocarcinoma com diferenciação trofoblástica¹⁴.

Berney e colaboradores²¹ representando todos os autores relacionados à nova classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) 2016 para tumores testiculares, sugerem um novo termo padrão para os precursores pré-invasivos de tumores malignos compostos por células germinativas indiferenciadas que proliferaram dentro de um túbulo seminífero e histologicamente observado adjacente ao tecido normal como "neoplasia de células germinativas *in situ*" (GCNIS)²¹. É uma lesão precursora presuntiva frequentemente associada aos TCGs que surgem na época da puberdade até a idade adulta jovem.

Assim os TCGs que surgem em crianças e adolescentes podem ser classificados em dois tipos, dependendo da idade de apresentação e características histológicas. Tumores tipo I geralmente presentes em crianças com menos de 4 anos de idade (teratomas, tumor de seio endodérmico ou tumor misto) e tumores do tipo II (puberdade e adulto jovem) que apresentam toda a gama de histologias seminomatosas e não-seinomatosas. O GCNIS não é observado adjacente aos tumores do Tipo I (**Figura 7**)¹⁴.



Fonte: Adaptado de Pierce et al.¹⁴

Figura 7 - Desenvolvimento de linha germinativa e subtipos histológicos de tumores de células germinativas (TCGs).

Em geral, os TCGs não seminomatosos são mais propensos a serem resistentes às terapias padrão. Os TCGs podem se apresentar como uma forma pura, com apenas uma histologia ou como uma mistura de vários tipos, conhecido como tumor de células germinativas malignas mistas (MMGCT)¹⁴.

Várias são as classificações histológicas utilizadas para a distinção dos TCGs. Para efeito de uniformização da nomenclatura, neste trabalho será utilizada a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde/*World Health Organization* (OMS/WHO), 2016²² para os sítios primários. Assim, a classificação histopatológica é demonstrada na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Classificação histológica dos TCGs pela OMS/WHO 2016²².

Localização	Classificação	Subclassificação
Testículo	Germinoma	Seminoma
	Teratoma	Pré-Puberal ou Pós-Puberal
	Carcinoma Embrionário	
	Tumor de Seio Endodérmico	
	Coriocarcinoma	
	Tumor Misto	Combinação de pelo menos dois dos anteriores
Ovário	Germinoma	Disgerminoma
	Teratoma	Maduro ou Imaturo (Grau I, Grau II, Grau III)
	Carcinoma Embrionário	
	Tumor de Seio Endodérmico	
	Coriocarcinoma	
	Tumor Misto	Combinação de pelo menos dois dos anteriores
Extra Gonadal	Germinoma	
	Teratoma	Maduro ou Imaturo (Grau I, Grau II, Grau III)
	Carcinoma Embrionário	
	Tumor de Seio Endodérmico	
	Coriocarcinoma	
	Tumor Misto	Combinação de pelo menos dois dos anteriores

Fonte: OMS/WHO 2016²²

Abreviações: TCGs, Tumores de células germinativas; OMS, Organização Mundial de Saúde; WHO, *World Health Organization*.

Como os TCGs podem ocorrer em diversas partes do organismo de uma pessoa, para definir o estadiamento é utilizada uma classificação específica para cada local de acometimento. Sendo assim, para tumores ovarianos é utilizado o estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) versão 2014²³ e para tumores testiculares é

utilizado o estadiamento dos grupos americanos *Pediatric Oncology Group* (POG) e *Children's Cancer Group* (CCG) juntamente propuseram em 2004²⁴.

Em geral, os tumores de células germinativas malignos possuem excelente sobrevida com ressecção cirúrgica conservadora e tratamento quimioterápico baseado em cisplatina. Entretanto, seja o tratamento unicamente cirúrgico ou cirúrgico atrelado à quimioterapia, a classificação de risco é baseada nestes estadiamentos.

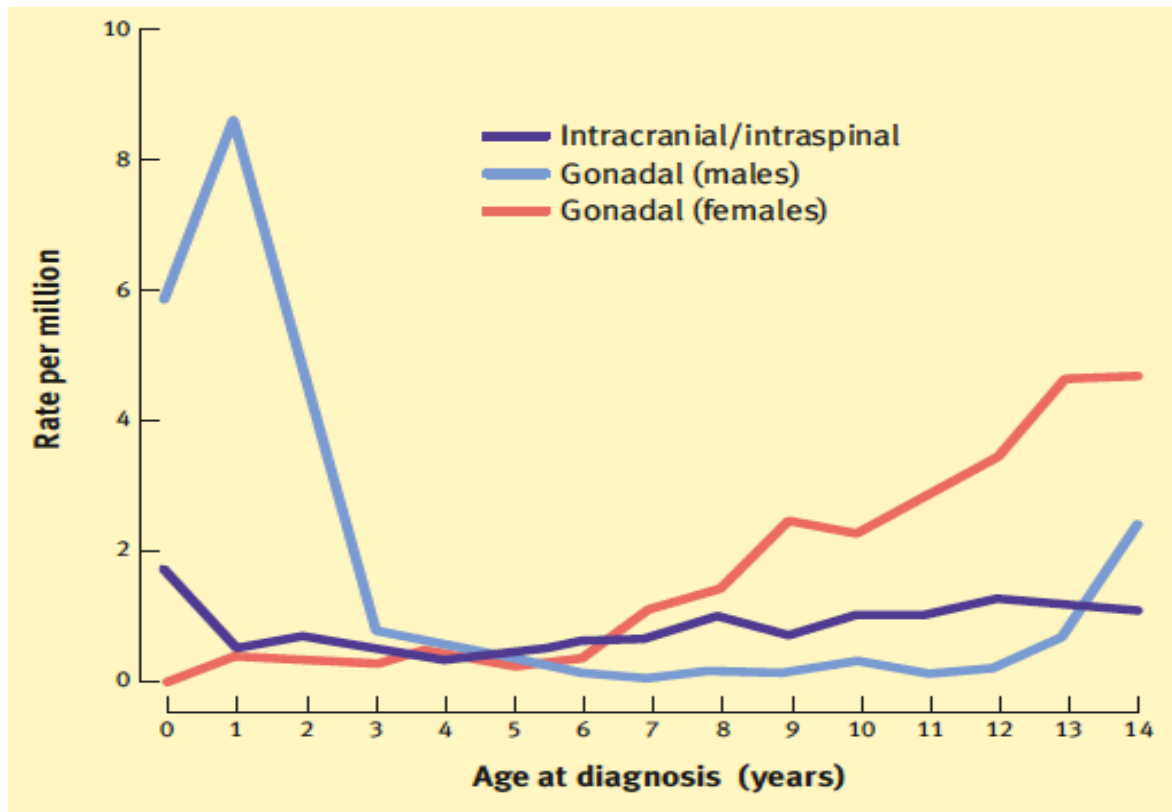
1.4 Epidemiologia dos tumores de células germinativas (TCGs)

Durante o período 1975 até 1995 nos Estados Unidos, pelo *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program* (SEER), um total de 2.065 crianças com menos de 20 anos de idade foram diagnosticados com tumores de células germinativas e outras neoplasias gonadais na Classificação Internacional do Câncer Infantil. Isto representa 7% de todas as neoplasias diagnosticadas entre crianças menores de 20 anos de idade, sendo 3,5% de todas as neoplasias para crianças menores de 15 anos e uma proporção muito maior de 13,9%, para 15-19 anos²⁵.

Em um estudo retrospectivo de registro populacional alemão, entre 1980 e 2016, foram registrados 59.116 pacientes com diagnóstico de câncer na infância e foram acompanhados por uma média de 15,1 anos. Destes 3% (1,763 casos) eram portadores de TCGs com sobrevida superior a 98%²⁶. Uma criança com menos de 15 anos em 13.000 é afetada por tumores de células germinativas. Alguns tornam-se mais frequentes à medida que a puberdade se instala, outros são típicos para bebês, porém são raros do quarto ao sétimo ano de vida. Meninas menores de 15 anos têm incidência cerca de 30% maior²⁷. A porcentagem de mortes precoces tem diminuído consideravelmente e no estudo alemão houve diminuição de 2,6% na década de 1980 para 0,6% em 2016²⁶.

Os TCGs malignos têm uma incidência anual de 4 por milhão de crianças menores de 15 anos de idade. Teratomas são relatados de forma menos consistente aos registros de câncer, mas acredita-se que sejam responsáveis por aproximadamente metade de todos os casos²⁸. Naquele modelo de microsimulação para incidência de câncer infantil de 200 países e outros territórios em todo o mundo. Ward e colaboradores⁷ estimaram que havia 396.657 casos incidentes de câncer infantil em todo o mundo em 2015, dos quais 6.528 (1,65%) eram TCGs

gonadais⁷. Na infância, a distribuição etária é bimodal, com pico em menores de 5 anos e novamente na adolescência (**Figura 8**)^{28, 29}.



Fonte: Murray & Nicholson²⁸

Figura 8 - Taxas de incidência de tumores em células germinativas, Grã-Bretanha 1962-1997.

É sabido que nos Estados Unidos, a taxa de incidência dos TCGs em crianças de 0 a 14 anos é de 0,4 por 100.000 em meninos e 0,6 por 100.000 em meninas³⁰. A incidência em adolescentes juntamente com adultos jovens (13-24 anos) pode ser muito maior, chegando a 6 por 100.000 para o sexo masculino e 0,8 para o sexo feminino²⁸. Quando se avalia TCGs somente em adolescentes a taxa de incidência é de 11,4 por 100.000 em homens e um por 100.000 em mulheres³¹. Ainda existem diferenças na apresentação de sexo por localização, sendo a população feminina mais acometida em TCG sacrococcígeos e a população masculina predominante dentre tumores intracranianos e mediastinais²⁸.

Embora o câncer testicular seja o mais comum câncer em homens jovens (entre 25 e 35 anos), em relação à maioria das formas de câncer, é uma doença rara. Em populações

consideradas de alta frequência da doença, a incidência ao longo da vida (até a idade 75 anos) é de aproximadamente 0,5%, ou seja, um em 200 homens são afetados³².

Em relação aos tumores ovarianos em mulheres adultas, os tumores de origem epitelial e estromal ocorrem mais frequentemente até a idade de 20 anos, ao passo que na pediatria 2/3 dos tumores ovarianos são tumores de células germinativas^{18, 33, 34}. A grande maioria é representada por teratoma cístico maduro e uma minoria são tumores malignos incluindo teratoma imaturo, disgerminoma, tumor do saco vitelino, carcinoma de células embrionárias e coriocarcinoma³⁴. Como outra particularidade dos tumores ovarianos, nota-se a sua correlação clínica e fisiopatológica com as disgenesias gonadais³³. Num estudo francês avaliando pacientes portadores de TCGs de 1995 a 2019 encontrou-se sete pacientes com fenótipo feminino com distúrbio do desenvolvimento sexual tais como cariótipo 46XY, disgenesia gonadal, mosaico 46XX, e 45X0, alterações puberais espontâneas e tumores bilaterais em quatro casos³⁵.

No Brasil, o grupo de pesquisadores que estudam os TCGs pediátricos existem desde a década de 90 e é denominado Grupo Brasileiro de Tumores de Células Germinativas da Infância. Assim, desde primeiro de maio de 1991 até 31 de dezembro de 2019, 1.015 pacientes foram registrados como sendo portadores de TCGs. Avaliando a frequência dos casos brasileiros já publicados por localização foi observado que em torno de 70% dos TCGs acometem as gônadas (testículo e ovário), seguido da localização sacrococcígea com quase 15% (**Tabela 3**). Vale ressaltar que a maioria dos serviços que cadastraram seus pacientes no banco de dados do grupo são de oncologia pediátrica; desta forma, acredita-se que muitos casos de teratoma podem não ter sido cadastrados³⁶.

Tabela 3 - Distribuição de frequência e porcentagem dos pacientes com tumores de células germinativas (TCGs) cadastrados nos protocolos brasileiros já publicados.

Sítio primário	Número de casos	Porcentagem de casos
Ovário	422	41,6%
Testículo	261	25,7%
Sacroccoccígea	147	14,5%
Mediastino	56	5,5%
Outros	129	12,7%
Total	1015	100

Fonte: Lopes³⁶

1.5 Marcadores biológicos dos TCGs

Os principais marcadores biológicos dos TCGs são alfafetoproteína (AFP) e a fração beta da gonadotrofina coriônica (BHCG). Entretanto, teratomas maduros e germinomas não secretam AFP nem BHCG.

A AFP é uma glicoproteína plasmática, semelhante à albumina, constituída por 590 aminoácidos, produzida pelo fígado. Não é específico dos TCGs, podendo ser expressa em hepatoblastoma e carcinoma hepatocelular.

Durante a vida intrauterina é produzida pelo saco vitelínico e é quando são encontradas em seus maiores níveis. Com meia-vida de aproximadamente sete dias, a AFP tem sua dosagem máxima no líquido amniótico, soro fetal e soro materno nas 10^a, 14^a e 32^a semanas de gestação. Em bebês nascidos a termo, seu nível é em média 30,000ng/dL com acentuada queda pós-natal, chegando ao seu nadir após 24 meses de idade. Após esse período, sua expressão entra em um platô, entretanto, pode sofrer alteração caso haja algum distúrbio orgânico pois não há função conhecida em adultos. Algumas condições podem estar relacionadas ao aumento dos níveis de AFP intrauterino, como abortamento, gravidez gemelar, defeito anatômico do tubo neural, diabetes materna e incompatibilidade RH e a síndrome de Down está relacionada com a diminuição destes níveis. Além disso, tumores com elementos do saco vitelínico como TCG ou hepatoblastoma podem produzir AFP que devem estar menores que 10 ng/dL em adultos³⁷⁻³⁹.

No estudo de Blohm e colaboradores (1998)³⁹ foi demonstrado que as idades gestacional e pós-natal influenciam nos níveis de AFP. Foram utilizadas 637 amostras de soro de 390 crianças de zero a 720 dias de vida, sendo um grupo de crianças nascidas a termo e sem fatores que contribuíssem para aumento de AFP e um grupo de bebês prematuros. Assim obtiveram-se os valores séricos de AFP que são utilizados no manejo clínico para diagnóstico e acompanhamento dos doentes portadores de TCG.

BHCG é uma glicoproteína hormonal, produto de células do sinciotrofoblasto. Entretanto, também é secretado por tumores derivados do tecido trofoblástico, incluindo o coriocarcinoma e também na doença trofoblástica gestacional. A natureza complexa dos produtos de degradação do BHCG intacto, da meia-vida dos produtos de degradação e das reações cruzadas dos vários produtos de degradação com os vários anticorpos, explica a discrepância entre os resultados da dosagem de gonadotrofina coriônica feita nos diferentes

laboratórios e, num mesmo laboratório, com o mesmo *kit*, entre as diferentes amostras do material⁴⁰.

A desidrogenase láctica (DHL) é a catalizadora da oxidação/conversão de lactato a piruvato e quando há lesão ou qualquer injúria tecidual como neoplasias, inflamações e infecções seus níveis podem ser acumulados no soro de um paciente. Em 2016, Lopes e colaboradores⁴¹ confirmaram, em um modelo multivariável, a importância das concentrações elevadas de DHL na previsão de resultados de sobrevida ruins para todos os pacientes com TCGs, independentemente do estadiamento ($p=0,002$). Ao analisar os dados do grupo de alto risco, o nível elevado de DHL ($p=0,05$) também foi significativo, como um fator independente⁴¹.

Alfafetoproteína e a BHCG são encontradas em cerca de 70-80% dos tumores não seminomatosos e estão entre os mais sensíveis parâmetros sorológicos para controle da atividade tumoral, ou seja, são úteis no acompanhamento pré e pós cirúrgico podendo mostrar grau de resposta ou mesmo progressão de doença durante o tratamento quimioterápico (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Marcadores tumorais encontrados em TCGs.

Marcador Tumoral	AFP	BHCG
Germinoma	-	+/-
Teratoma	-	-
Carcinoma Embrionário	+	+
Tumor de Seio Endodérmico	+++	-
Coriocarcinoma	-	+++

Fonte: Dieckmann³⁸

Abreviações: TCGs, Tumores de células germinativas; AFP, Alfafetoproteína; BHCG, Fração beta da gonadotrofina coriônica.

Portanto, uma vez que não existe um marcador de prognóstico específico para os TCGs, é necessário o desenvolvimento de novos estudos e ferramentas com a finalidade de se obter um diagnóstico precoce e preciso, sendo capaz de nortear o melhor esquema terapêutico.

Atualmente o diagnóstico dos tumores de células germinativas se faz pelo quadro clínico apresentado pelo doente que se difere pelo sítio primário do tumor associado aos marcadores

tumorais séricos consagrados citados e a comprovação imagenológica da massa tumoral (ultrassonografia, tomografia computadorizada e/ou ressonância nuclear magnética).

1.6 Estadiamento, estratificação de risco e tratamento

Muitos órgãos e instituições que trabalham com câncer infantil propuseram diferentes formas de avaliar os TCGs em sua apresentação inicial bem como seu tratamento e forma de acompanhamento.

O Grupo Brasileiro de Tumores de Células Germinativas da Infância, do qual nosso grupo faz parte, uniu mais de 50 Instituições dispostas a estudar e entender TCGs infantis no Brasil, sendo registrados mais de mil pacientes. Desde então, três protocolos de tratamento (Protocolo TCG-91; Protocolo TCG-99; Protocolo TCG-2008) foram realizados e mais atualmente a quarta edição está sendo realizada desde de 2017 com países da América Latina (Protocolo TCG-GALOP 2017).

No decorrer dos anos este grupo utilizou diferentes modalidades de estadiamento e quimioterapias para que pudesse definir a melhor avaliação e manejo destes doentes. O estadiamento dos tumores de células germinativas é realizado conforme o local de acometimento primário da doença, uma vez que ocorrem em qualquer local do organismo. Utilizamos o estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) versão 2014²³ para tumores ovarianos (**Quadro 1**).

Quadro 1 - Sistema de estadiamento do câncer de ovário, tuba uterina e peritoneal correspondente FIGO, 2014.

<p>Estadio I, Tumor confinado aos ovários e tubas uterinas</p> <p>IA: tumor limitado a um ovário (cápsula intacta) ou tuba uterina, superfície ovariana ou da tuba uterina livre e lavado peritoneal ou ascite com células neoplásicas ausentes</p> <p>IB: tumor limitado a ambos os ovários (cápsula intacta) ou tuba uterina, superfície ovariana ou da tuba uterina livre e lavado peritoneal ou ascite com células neoplásicas ausentes</p> <p>IC: tumor limitado a um ou ambos os ovários, juntamente com 1 dos seguintes:</p> <p>IC1: ruptura da cápsula intraoperatória</p> <p>IC2: ruptura da cápsula pré-operatória ou tumor na superfície do ovário ou trompa</p> <p>IC3: células malignas na ascite ou líquido peritoneal</p>
<p>Estadio II – Tumor envolvendo um ou ambos os ovários ou trompas com extensão pélvica ou carcinoma primário de peritônio</p> <p>IIA: Extensão e/ou metástases para útero e/ou trompas e/ou ovários</p> <p>IIB: Extensão para outros tecidos pélvicos</p>

continua na próxima página

Quadro 1 (continuação) - Sistema de estadiamento do câncer de ovário, trompa de falópio e peritoneal correspondente FIGO, 2014.

<p>Estadio III – tumor envolvendo um ou ambos os ovários ou trompas ou carcinoma primário peritônio com implantes peritoneais fora da pelve e/ou linfonodos retroperitoneais positivos</p>
<p>IIIAI. Apenas linfonodos retroperitoneais positivos, mas com confirmação histológica/citológica dos implantes peritoneais</p> <p style="padding-left: 20px;">IIIAI(i): metástases com máximo de 10mm (≤ 1 cm)</p> <p style="padding-left: 20px;">IIIAI(ii): metástases maior 10mm (> 1 cm)</p> <p>IIIA2: metástase microscópica peritoneal extrapélvica com ou sem linfonodo retroperitoneal positivo</p> <p>IIIB: metástase macroscópica pélvica de até 2 cm com ou sem metástase em linfonodo retroperitoneal (incluindo cápsula hepática/esplênica, mas excluindo metástase em parênquima)</p> <p>IIIC: metástase macroscópica pélvica maior que 2 cm com ou sem metástase em linfonodo retroperitoneal (incluindo cápsula hepática/esplênica, mas excluindo metástase em parênquima)</p>
<p>Estadio IV: tumor em um ou ambos os ovários, com metástases à distância fora da cavidade peritoneal</p>
<p>IVA: derrame pleural positivo</p> <p>IVB: metástases em parênquima hepático e órgãos extra-abdominais (incluindo linfonodo inguinal e linfonodo extra-abdominal)</p>

Fonte: Prat & Committee on Gynecologic Oncology²³.

Avaliando os protocolos TCG-99 e TCG-2008 foram cadastrados 102 pacientes classificados como estadio I para tumores ovarianos sendo em sua maioria teratomas e disgerminomas. A maioria também foi tratada somente cirurgicamente e somente 3 pacientes apresentaram recidiva tumoral sendo dois deles retratados e vivos. Além disso, um estudo recente publicado pelo consórcio internacional MaGIC (*Malignant Germ Cell International Collaboration*) com participação de diversos países, mostrou que os fatores relacionados à pior sobrevida livre de doença a longo prazo eram estadio IV, idade maior de 11 anos e tamanho do tumor. Entretanto, mostraram que para os tumores ovarianos, o estadio IV menores de 11 anos a sobrevida foi semelhante à sobrevida dos pacientes de ovário estadio III⁴².

Sendo assim, pacientes alocados como estadio I (A, B, C1, C2, C3) serão estratificados para baixo risco. Pacientes alocados como estadio II (A, B), III (A1i, A1ii, A2, B, C) e IV (A, B) menores que 11 anos serão estratificados para risco intermédio. E pacientes alocados como estadio IV (A, B) maiores que 11 anos serão estratificados para alto risco (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Estratificação de risco para TCG ovariano.

RISCO	FIGO
Baixo	IA IB IC (IC1, IC2, IC3)
Intermédio	II (IIA, IIB) III (IIIA - IIIA1i, IIIA1ii, IIIA2 - IIIB, IIIC) IV (IVA, IVB) < 11 anos
Alto	IV (IVA, IVB) ≥ 11 anos

Fonte: Frazier et al.⁴²

Abreviações: TCG, Tumor de célula germinativa; FIGO, Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia.

Utilizamos o estadiamento dos grupos americanos *Pediatric Oncology Group* (POG) e *Children's Cancer Group* (CCG) que juntamente propuseram em 2004^{24, 43} para tumores testiculares que estão representados na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Estadiamento de TCG testicular.

Estadiamento	Descrição
Estadio I	Limitado ao testículo Completamente ressecado por orquiectomia inguinal alta Ausência de evidência clínica, radiológica ou histológica de doença além dos testículos Marcadores tumorais normais 4-6 semanas após a cirurgia
Estadio II	Orquiectomia trans-escrotal com ou sem rotura do tumor Doença microscópica no escroto ou cordão espermatóico (< 5 cm do final proximal) Envolvimento de linfonodo retroperitoneal (<2,0cm) e /ou aumento dos marcadores tumorais após meia-vida esperada
Estadio II	Persistência de marcadores positivos nos estádios I, 4-6 semanas após cirurgia
Estadio III	Envolvimento de linfonodos retroperitoneais (>2,0cm) Sem envolvimento visceral ou extra-abdominal
Estadio IV	Metástases à distância

Fonte: Cushing et al.⁴³

Transferindo o mesmo raciocínio sobre fatores de risco e sobrevida em relação aos tumores ovarianos para testiculares, com base no mesmo estudo do grupo MaGIC⁴² avaliando os casos de TCGs testicular incluídos nos 3 protocolos brasileiros (TCG-91, TCG-99 e TCG-2008), podemos propor que os pacientes com tumor de testículo estadio I, qualquer subtipo histológico, sejam estratificados para baixo risco, pacientes estadios II, III e IV com idade inferior a 11 anos, sejam estratificados para risco intermédio e pacientes estadios IV com idade superior a 11 anos, sejam estratificados para alto risco (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Estratificação de risco para TCG testicular.

RISCO	POG/CCG
Baixo	I
Intermédio	II
	III
	IV < 11 anos
Alto	IV ≥ 11 anos

Fonte: Frazier et al.⁴²

Abreviações: TCG, Tumor de célula germinativa; POG, *Pediatric Oncology Group*; CCG, *Children's Cancer Group*.

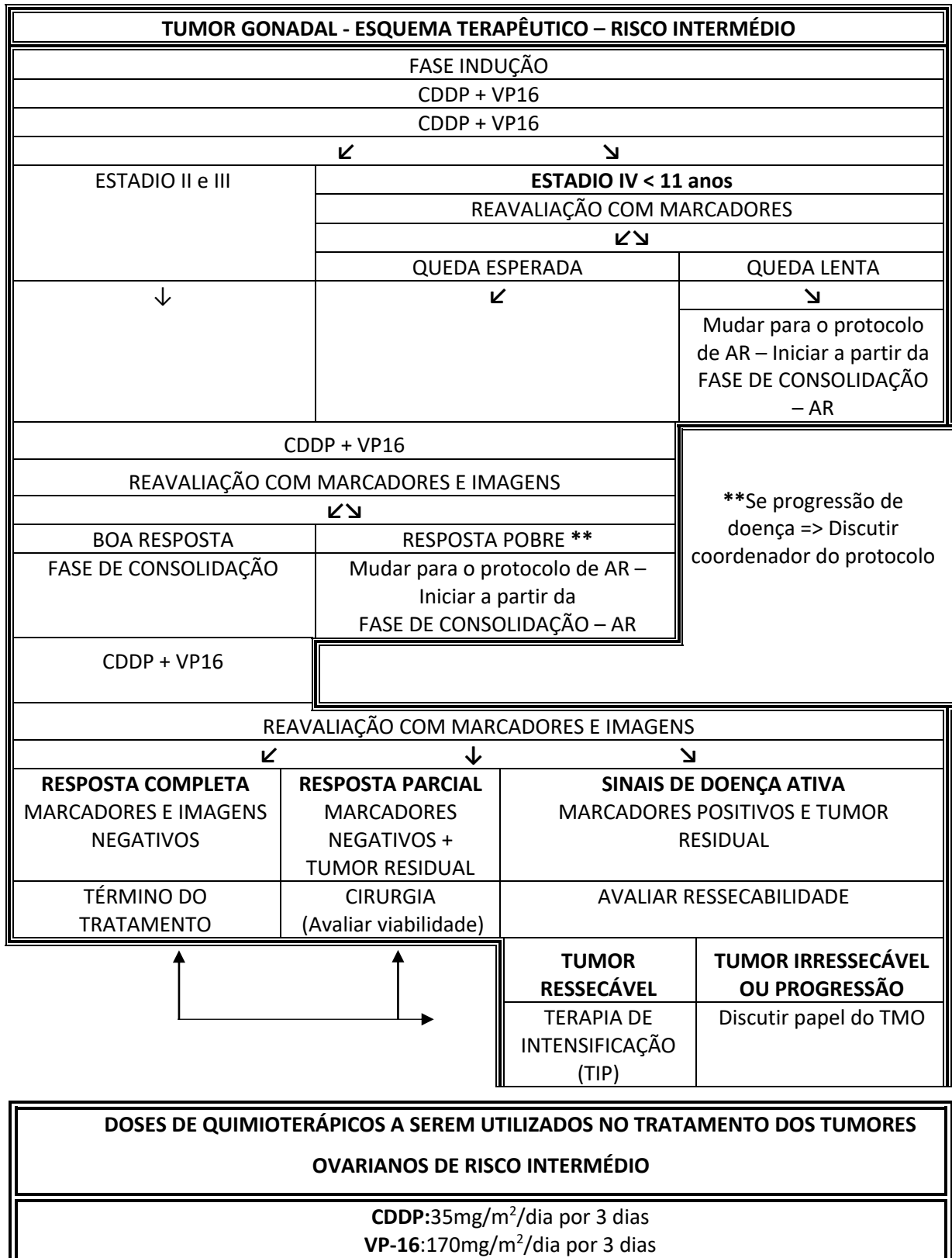
A partir da década de 70, foram introduzidos agentes quimioterápicos mais efetivos para tratamento dos TCGs⁴⁴ e estudos com combinações desses agentes mostraram respostas significativas mesmo em doenças avançadas. Como os TCGs são tumores raros na infância, as informações a respeito da resposta desses tumores à quimioterapia foram obtidas em adultos. Antes disso, o tratamento preconizado para este tipo de tumor era somente a cirurgia, sendo que somente paciente com tumores germinativos estadio I foram, de fato, curados cirurgicamente. Os demais faleciam por doença progressiva devido à falta de terapia sistêmica efetiva.

As combinações quimioterápicas, incluindo cisplatina, representaram um dos maiores avanços no tratamento dos TCGs^{44, 45}. A superioridade de esquema contendo cisplatina foi reproduzida em trabalhos com crianças e descrita por Pinkerton⁴⁶ entre outros autores.

Pacientes com falha à quimioterapia prévia mostraram resposta ao etoposídeo⁴⁶ além de um sinergismo de ação entre cisplatina e etoposídeo em estudo com animais⁴⁷.

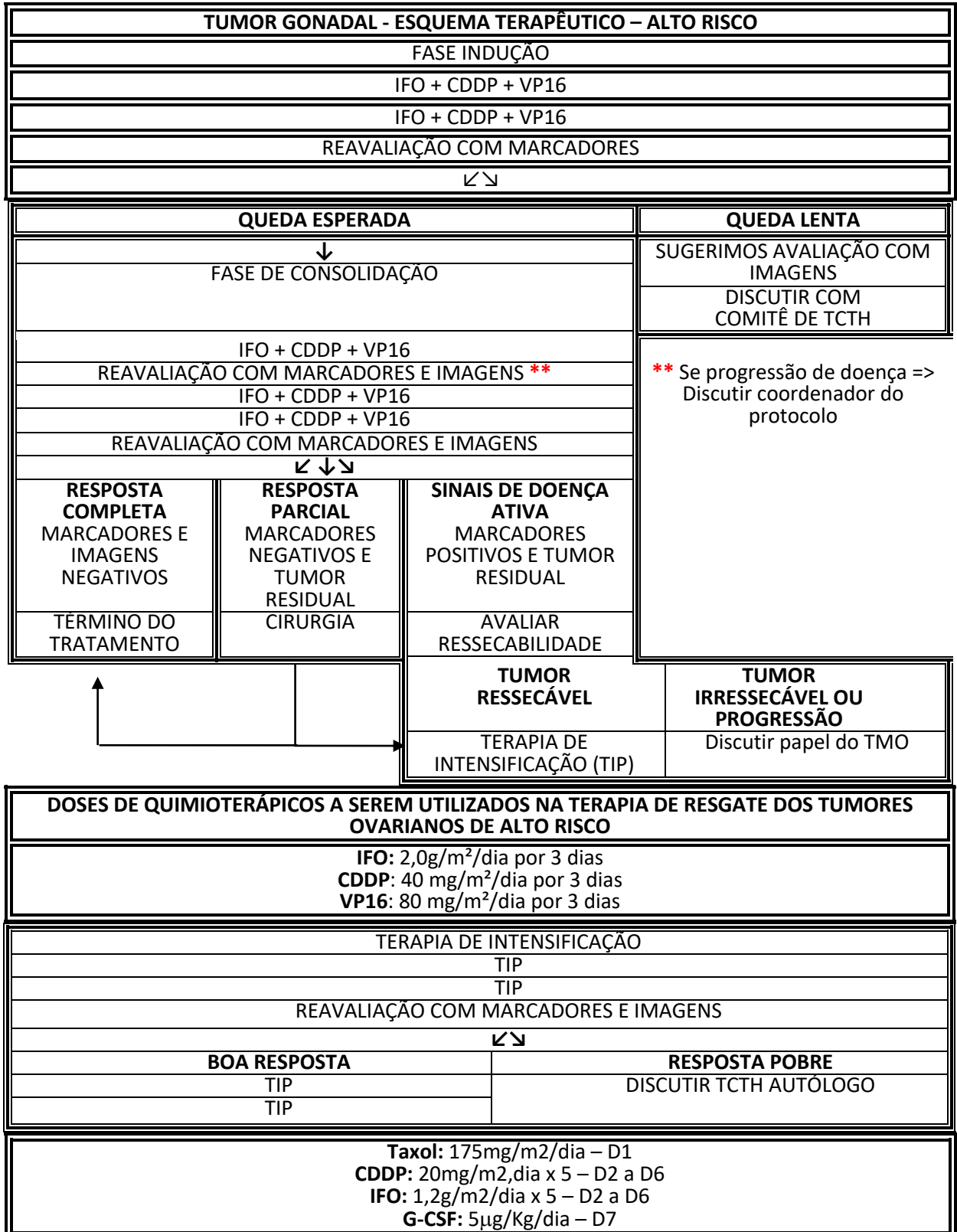
Atualmente, o tratamento de todos os tipos histológicos dos tumores de células germinativas é dividido pela estratificação de risco que vem atrelada ao estadiamento tumoral. Para tumores gonadais estadios I estratificados para baixo risco o tratamento é realizado somente com cirurgia e sem adjuvância. Pacientes estadios II, III e IV com idade inferior a 11 anos, estratificados para risco intermédio, recebem quimioterapia com apenas dois quimioterápicos (Cisplatina e Etoposídeo) num total de quatro ciclos e seguem com reavaliações com exames de imagem e marcadores sorológicos periodicamente. Os pacientes com tumores gonadais estadio IV com idade maior ou igual a 11 anos estratificados para alto risco recebem tratamento com três quimioterápicos (Cisplatina, Etoposídeo e Ifosfamida) num total de cinco ciclos, também sendo reavaliados com marcadores tumorais sorológicos e com exames de imagens.

As **Figuras 9 e 10** demonstram os fluxogramas de tratamento de TCGs pela estratificação de risco intermédio e alto risco, respectivamente, bem como as doses dos quimioterápicos, segundo o protocolo TCG-GALOP 2017.



Fonte: Lopes³⁶

Figura 9 - Esquema terapêutico para tumor de células germinativas classificado como risco intermédio.



Fonte: Lopes³⁶

Figura 10 - Esquema terapêutico para tumor de células germinativas classificado como alto risco.

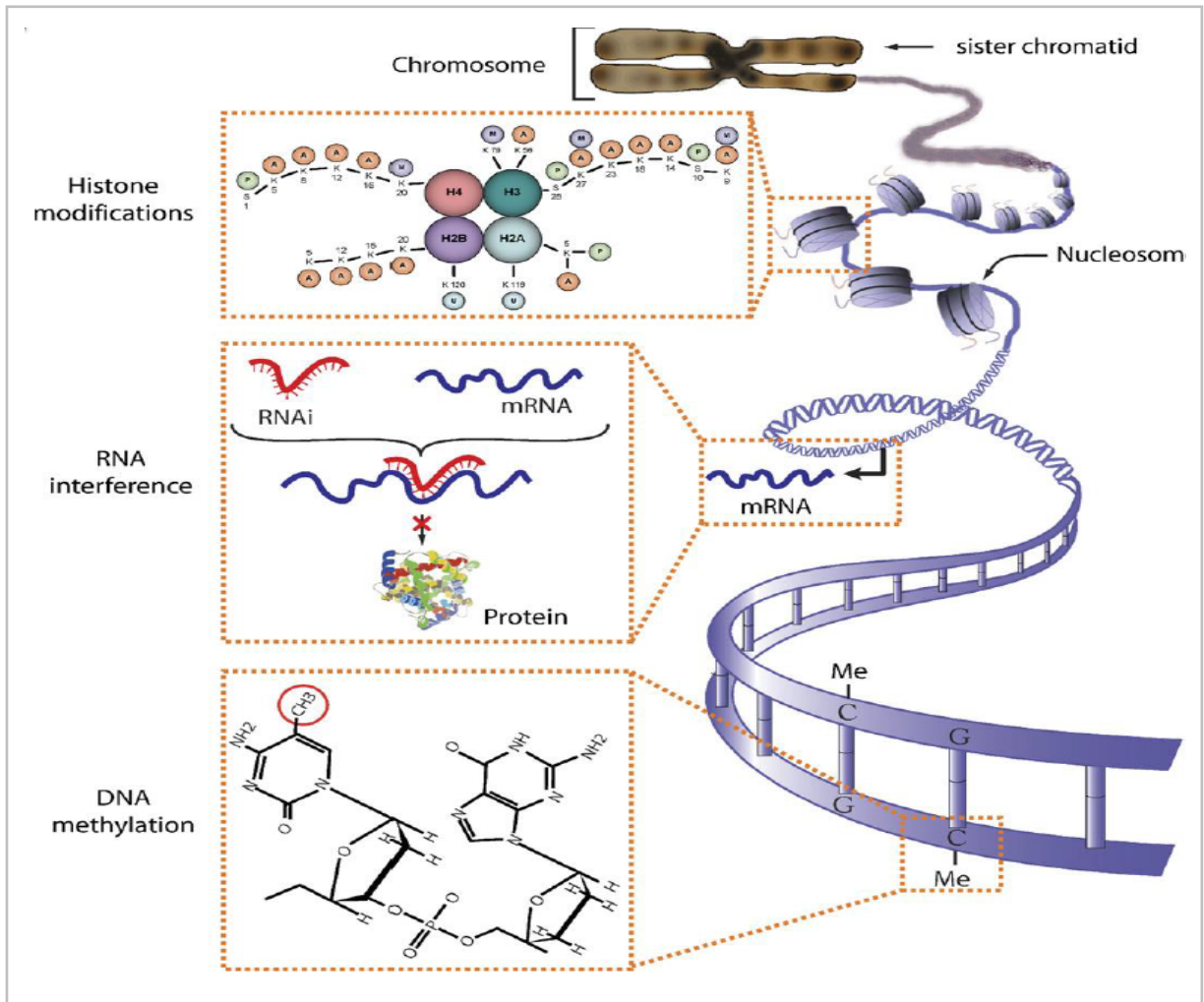
1.7 Alterações genéticas e epigenéticas dos TCGs

A primeira anormalidade cromossômica relatada nos tumores de células germinativas foi a duplicação do braço curto do cromossomo 12⁴⁸. Uma análise em 124 adultos com TCGs testicular identificou, em 86% dos casos, o isocromossomo 12p [i(12p)] em todos os tipos histológicos de TCGs e o denominou como um marcador⁴⁹. Outros estudos envolvendo demais cromossomos também foram realizados em TCGs mostrando deleções e ganhos cromossomiais em adultos.

Em um trabalho realizado pelo nosso grupo, foi demonstrado, numa análise retrospectiva de 150 casos de TCG testicular em adultos, que a instabilidade de microssatélites e mutação BRAF estavam ausentes em todas as amostras, inclusive em casos refratários e linhagens celulares, descartando a possibilidade do seu uso como biomarcadores⁵⁰. Ainda, nosso grupo avaliou a presença de mutações na região promotora do gene *TERT* em uma série de 150 casos de TCG testiculares e quatro linhagens de células tumorais de células germinativas. Foi demonstrado, pela primeira vez, que as mutações do promotor *TERT* ocorrem em um pequeno subconjunto (~ 3%) de TCGs testiculares⁵¹.

Além das alterações genéticas no DNA das células serem fundamentais para o início e crescimento de um tumor, outros três mecanismos principais de alterações epigenéticas podem estar ligados ao desenvolvimento do câncer, incluindo metilação do DNA, modificação das histonas e ação de RNAs não codificadores (**Figura 11**)^{52, 53}.

Diversos mecanismos epigenéticos estão envolvidos com a indução e/ou progressão tumoral, incluindo os miRNAs. Uma nova era na biologia molecular iniciou com a descoberta do primeiro miRNA há mais de 20 anos. Existem mais de 2.000 miRNAs descritos em seres humanos e estima-se que eles regulam coletivamente um terço dos genes no genoma humano⁵⁴.



Fonte: Sawan et al.⁵²

Figura 11 - Mecanismos distintos de regulação epigenéticas: A metilação do DNA, as modificações das histonas e a interferência da expressão gênica mediada pelo RNA, incluindo os microRNAs.

Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos não codificantes (*noncoding RNA*), filogeneticamente conservados e formados em média por uma sequência de 18 a 25 nucleotídeos⁵⁵. MicroRNAs exercem um importante papel na regulação pós-transcricional, por meio da clivagem ou repressão da tradução dos RNA mensageiros (RNAm) alvos. Podem desempenhar um papel crucial na proliferação, diferenciação e apoptose celular, e a alteração em sua expressão pode levar à oncogênese⁵⁶.

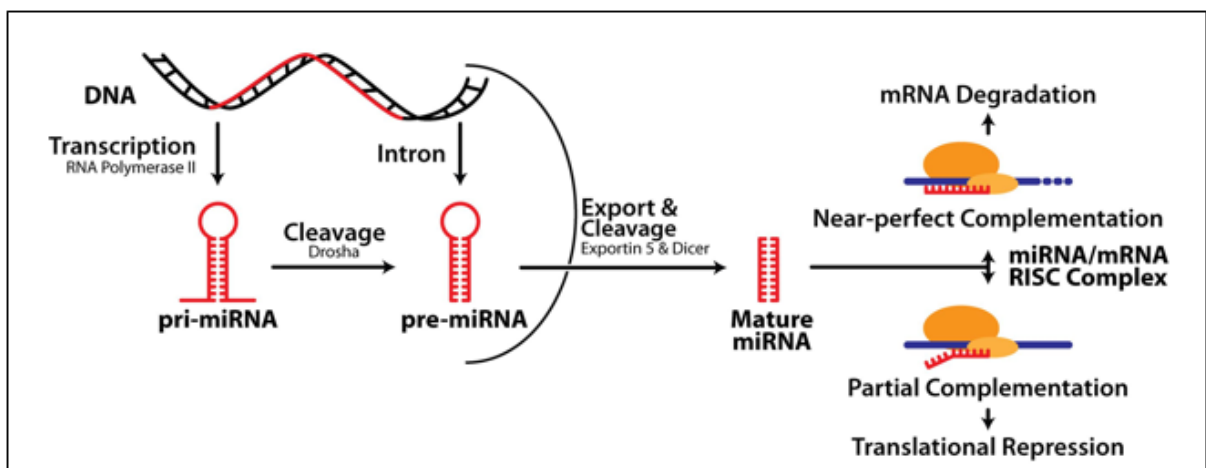
O processo de síntese dos miRNAs é complexo e depende de enzimas e proteínas situadas no núcleo ou no citoplasma da célula⁵⁷. A biogênese dos miRNAs se inicia no núcleo pela transcrição de um precursor, pela RNA polimerase II, denominado de pri-miRNA^{58, 59}. O

pri-miRNA possui uma alça (*loop*), cap na região 5' e poliadenilação na região 3'. Ainda no núcleo das células, o pri-miRNA é processado pelo complexo Drosha-DGCR8^{60, 61}, formando o pré-miRNA⁶⁰.

O pré-miRNA é transportado para o citoplasma via Exportina-5 e processado pela duplex TRBP-Dicer perdendo o *loop* e transformando-se em um miRNA dupla-fita maduro com aproximadamente 22 nucleotídeos⁶². A TRBP ainda ligada à Dicer recruta a proteína Argonata (Ago2) e forma o complexo de silenciamento induzido de RNA (RISC). Uma das fitas do miRNA maduro associa-se a esse complexo, ao passo que a outra é degradada. Nesse momento o complexo RISC guia uma das fitas de miRNA maduro até o RNAm alvo para que haja sua regulação (**Figura 12**)⁶³.

A inibição da tradução do RNAm geralmente ocorre após a ligação complementar com pelo menos cinco dos oito nucleotídeos da região 5' do miRNA, denominada região da semente (*seed region*)⁶⁴.

Foi relatado que aproximadamente 20 a 30% dos genes humanos podem ser controlados pelos miRNAs^{65, 66}. O papel funcional dos miRNAs na saúde e doença têm sido parcialmente elucidado e a literatura infere que os miRNAs provavelmente atuam como genes supressores de tumor ou oncogenes⁶⁷.



Fonte: Ryan et.al⁶⁸

Figura 12 - Biogênese dos miRNAs.

Estudos têm demonstrado a relação dos miRNAs com o câncer. Foi observado, em câncer de pulmão, que a expressão reduzida de *Dicer* se correlaciona com a redução sobrevivência pós-operatória, o que indica que *Dicer* pode ser capaz de prevenir a

transformação do tecido pulmonar, apresentando características supressoras de tumor. Ademais, a proteína Argonauta, agrupados no cromossomo 1 (1p34-35) e componentes cruciais do complexo RISC, foi associada a vários tipos de câncer. Três genes Argonauta (*AGO3*, *AGO1* e *AGO4*) são frequentemente diminuídos em pacientes com tumores de Wilms do rim, bem como associados a tumores neuroectodérmicos. O gene Argonauta *HIWI*, mapeia para a região genômica 12q24,33, que é um *locus* associado a seminomas testiculares, indicando que *HIWI* pode ter atividade oncogênica e pode funcionar normalmente para controlar a proliferação e manutenção das células germinativas⁶⁹.

Existem diversos miRNAs maduros⁶⁵ que regulam várias funções nas células como proliferação, sobrevivência e apoptose e sua expressão aberrante tem sido intimamente associada com muitas doenças, incluindo o câncer⁷⁰⁻⁷⁵. A desregulação de certos miRNAs são associados a eventos específicos de formação de câncer e diferentes miRNAs tem sido identificados em numerosos tipos de câncer em humanos⁷⁶.

A diferenciação celular pode ser controlada por miRNAs, assim os perfis de expressão de miRNAs em tumores em comparação com tecidos normais podem representar o grau de diferenciação dessas células tumorais. Anormalidades na expressão de miRNA podem resultar diretamente na desdiferenciação de células, permitindo que o tumor ocorra⁶⁹.

Estudos demonstraram que vários grupos de miRNAs séricos ou circulantes foram aberrantemente desregulados em pacientes com câncer, sugerindo o uso de miRNAs séricos como marcadores prognósticos do câncer⁷⁷⁻⁷⁹. Além disso, outro importante papel dos miRNAs no câncer é a previsão de resultados de acordo com o nível de sua expressão⁸⁰.

A análise de expressão de miRNAs em TCG iniciou em 2006 quando Voorhoeve e colaboradores⁸² avaliaram a expressão do cluster do miR-371 ~ 373 em tumores de células germinativas testiculares (TCGT) e linhagens celulares. Foi observada uma superexpressão dos miR-372 e miR-373 e que esses miRNAs juntamente com *RAS*, induziram a transformação neoplásica na presença de TP53, uma proteína que responde a danos no DNA induzindo apoptose e parada do ciclo celular. Assim, foi sugerido que os miR-372 e miR-373 tem potencial envolvimento no desenvolvimento dos TCGT permitindo o crescimento tumorigênico⁸¹. Na tentativa de elucidar a expressão dos miRNAs em TCGs, um estudo realizou uma triagem quantitativa de miRNAs em diferentes tipos histológicos de TCGs humanos e observaram que os miR-19a, miR-29a e miR-155 estavam superexpressos,

enquanto que os miR-133a, o miR-145 e o miR-146 apresentaram uma baixa expressão nos TCGs testiculares⁸².

Palmer e colaboradores avaliaram TCGs gonadais e extragonadais pediátricos e determinaram os perfis globais de miRNA comparando com amostras de TCGs gonadais malignos adultos. Em concordância com Voorhoeve e colaboradores⁸³, foi observada uma superexpressão dos agrupamentos miR-371 ~ 373 e miR-302, independentemente do subtipo histológico (tumor de saco vitelino/seminoma/carcinoma embrionário), local (gonadal/extragonadal), ou idade do paciente (pediátrico/adulto)⁸³. Nesse mesmo sentido, Syring e colaboradores⁸⁴ também exploraram o papel dos miRNAs séricos como novos biomarcadores em pacientes com TCGT. Foi demonstrado que os níveis séricos dos miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p e miR-373-3p foram significativamente aumentados no TCGT em comparação com indivíduos saudáveis e doenças testiculares não malignas. Em particular, o miR-371a-3p permitiu a identificação sensível (84,7%) e específica (99%) de pacientes com TCGT e, portanto, superou o teste de gonadotrofina coriônica humana ou de alfafetoproteína. Além disso, o miR-367-3p foi aumentado em não seminoma em comparação com pacientes seminoma. Os níveis séricos de miRNA foram elevados em pacientes com estadiamento avançado local e metástase. Em nove pacientes com TCGT localizado (estadio 1A clínico), os níveis séricos de miRNAs (miR-371a-3p) diminuíram após a cirurgia, indicando a liberação específica do tumor⁸⁴.

Em um estudo multicêntrico, amostras de soro de 616 pacientes com TCGTs (variação, 16–69 anos) e 258 controles masculinos foram examinadas para níveis séricos de miRNA-371a-3p. Os resultados mostraram que a medição dos níveis séricos de miR-371a-3p fornece uma sensibilidade e uma especificidade maiores que 90% e uma área sob a curva (AUC) de 0,96⁸⁵. Murray e colaboradores relatam o potencial de miR-371 ~ 373 e miR-302/367 como biomarcadores séricos de TCGs malignos na pediatria⁸⁶ suportando o uso de miRNAs como biomarcadores tumorais.

O uso do miR-371a-3p circulante foi analisado como um marcador para o manejo do tumor maligno de células germinativas em pacientes com TCGT (26–40 anos) antes da orquiectomia comparando com os marcadores séricos AFP, BHCG e DHL. O teste miR-371a-3p mostrou uma especificidade de 100%, sensibilidade de 93% e AUC de 0,978⁸⁷.

A expressão de miRNA também foi associada à linhagem celular de tumor de células germinativas resistentes à cisplatina. Há uma associação da regulação positiva de miR-512-3p,

miR-515, miR-517, miR-518 e miR-525 e regulação negativa de miR-99a, miR-100 e miR-145 com um fenótipo resistente à cisplatina em tumores de células germinativas humanas⁸⁸. No entanto, faz-se necessário avaliar esses mesmos miRNAs em amostras tumorais de pacientes com TCGs com sensibilidade e resistência à cisplatina.

Todos esses estudos demonstram de forma clara que os miRNAs são úteis para o manejo clínico dos TCGs, especialmente por monitorar a terapia e avaliar a doença residual após a quimioterapia. No futuro, a administração de oligonucleotídeos sintéticos que codificam sequências que são complementares a miRNAs oncogênicos maduros - denominados oligonucleotídeos anti-miRNA (AMOs) – podem efetivamente inativar miRNAs em tumores e retardar seu crescimento. Antagomirs surgiram como uma abordagem eficaz para inibir a atividade de miRNA em vários órgãos quando injetados em camundongos, e podem ser agentes terapêuticos promissores⁶⁹.

Portanto, os miRNAs são considerados biomarcadores clínicos e podem ser utilizados para superar a incerteza de cenários ambíguos, melhorando a qualidade do atendimento aos pacientes e contribuindo para uma medicina personalizada e precisa.

2 JUSTIFICATIVA

Os tumores de células germinativas têm suas características e tratamentos bem definidos, além de apresentarem altas taxas de cura e sobrevida devido à boa resposta à terapia. Entretanto, existem consequências significativas de terapias multimodais em termos de saúde geral, bem como de neoplasias secundárias tardias, o que impulsiona o desenvolvimento de novas pesquisas. Outra questão, é a dificuldade de estabelecer o diagnóstico e prognóstico desses pacientes. Os marcadores biológicos dos TCGs são AFP e BHCG e não são específicos desse tumor, podendo ser expressos em diferentes tipos de cânceres e doenças não malignas. Ademais, os TCGs são um grupo heterogêneo e podem ser classificados com diferentes tipos histológicos, incluindo teratomas maduro e imaturo, seio endodérmico, carcinoma embrionário, disgerminoma (ovário) e seminoma (testículo), coriocarcinoma e tumor misto sendo que alguns desses tipos histológicos não alteram a expressão de AFP e BHCG, dificultando o diagnóstico. Desse modo, faz-se necessária a elucidação de novos biomarcadores que permitam um diagnóstico mais específico e preciso, e, conseqüentemente, um melhor direcionamento terapêutico.

Neste contexto, diversos estudos têm sugerido o uso dos microRNAs como potenciais biomarcadores para diferentes tipos de cânceres, devido ao fato de serem potentes reguladores da expressão gênica. Entretanto, há uma escassez de informação do perfil de expressão dos microRNAs nos TCGs. Ainda, é importante ressaltar que a maioria dos estudos sobre microRNAs em TCGs são realizados em pacientes adultos e escasso na população infantil.

Portanto, há uma necessidade de analisar o perfil de expressão dos microRNAs em amostras de TCGs pediátricos. A avaliação dos miRNAs em larga escala pode auxiliar no diagnóstico precoce, predição de prognóstico e monitoramento do tratamento do tumor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o perfil de expressão dos microRNAs em amostras de tumores de células germinativas de ovário e testículo pediátricos.

3.2 Objetivos específicos

- Obter informações clínico-patológicas (evolução clínica, recidiva, sobrevida e resposta ao tratamento) de pacientes pediátricos (zero a 18 anos) portadores de tumor de células germinativas de ovário e testículo tratados ou em tratamento no Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos.
- Avaliar a expressão dos microRNAs em tumores de células germinativas de ovário e testículo pediátricos relacionando-os com dados clínico-patológicos.
- Relacionar a expressão dos microRNAs com os marcadores biológicos nos TCGs de ovário e testículo infantis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho e população do estudo

Trata-se de um estudo de coorte retrospectiva onde foram avaliados a expressão de microRNAs em amostras de tumores de células germinativas de ovário e testículo, condicionadas em blocos de parafina, provenientes de pacientes, com idade de 0 a 18 anos, tratado pelos Protocolos Brasileiros de TCG 99 e 2008 no Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos entre o período de janeiro de 2000 a dezembro de 2017.

4.2 Critérios de elegibilidade

Diagnóstico histopatológico de tumor de células germinativas de ovário e testículo de pacientes com idade inferior a 19 anos em biópsia tumoral pela equipe de patologia do Hospital de Câncer de Barretos/SP no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2017, com disponibilidade de material parafinado e de informações quanto à evolução clínica, recidiva, sobrevida e resposta ao tratamento nos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) da instituição envolvida.

4.2.1 Critérios de exclusão

- Pacientes com material inadequado ou insuficiente para análise histopatológica ou molecular.
- Tumores de células germinativas mistos.
- Ausência de material proveniente do tumor primário (ovário e testículo).
- Qualidade de RNA extraído inadequada ou baixa quantidade de RNA extraído.
- Pacientes que não possuam *follow-up* mínimo de três anos.

4.3 Aspectos éticos

Esse estudo obedeceu aos critérios éticos em conformidade com a resolução CNS nº 466 de 2012. Antes do seu início, o projeto de pesquisa foi submetido para apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) sendo aprovado pelo parecer de número 1692/2018 (**Anexo A**). Como tratou-se de um estudo retrospectivo,

observacional, que não envolveu diretamente seus participantes, foi solicitado a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ao CEP-HCB, uma vez que o presente trabalho utilizou somente lâminas e blocos de parafinas já armazenados no setor de patologia do Hospital de Câncer de Barretos e consulta em prontuário médico. O CEP-HCB compreendeu que por ser um estudo retrospectivo onde o pesquisador encontraria grande dificuldade em localizar os participantes para consenti-los e ainda considerando que uma população já tenha vindo a óbito, poderia causar grande desgaste emocional à família. Assim, eximiu tal projeto de aplicar o TCLE baseando-se no seu direito pela resolução 466/2012.

4.4 Desenho do estudo e fluxo de atividade

Inicialmente, possíveis participantes foram encontrados no banco de dados do Protocolo Brasileiro TCG-GALOP 2017 para tratamento de TCGs, cuja maioria dos integrantes da equipe coordenadora trabalha no serviço e possui acesso a este banco de dados. Posteriormente, foi utilizado o Sistema *Online* do Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos (SisOnco) para buscar os pacientes que apresentavam material tumoral armazenado no setor de Patologia do citado hospital.

O Sistema *Online* SisOnco, juntamente com a revisão dos respectivos prontuários físicos foram utilizados a fim de encontrar critérios de inclusão para o referido estudo. Os prontuários dos pacientes incluídos no estudo ficam arquivados no setor de Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME). Estes prontuários foram avaliados para obtenção de informações quanto à evolução clínica, recidiva, sobrevida e resposta ao tratamento tanto retrospectivamente como prospectivamente. A ficha de coleta foi formulada baseada na ficha de coleta do Protocolo Brasileiro TCG-GALOP 2017. Estes dados foram armazenados na plataforma RedCap (**Anexo B**) e posteriormente analisadas pelo software IBM-SPSS para *Windows/Mac*, versão 23.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), conjuntamente com Núcleo de Estatística e Bioinformática (NEB) do Hospital de Câncer de Barretos.

Por estes meios também foram coletadas as informações epidemiológicas e clínico-patológicas dos pacientes. O registro, a organização e a guarda dos dados levantados foram feitos através da plataforma eletrônica de captura de dados para pesquisa científica denominada REDCap® (*Research Electronic Data Capture*).

A partir de então, os blocos de parafina dos pacientes infantis com TCG gonadais foram selecionados, cortados, corados e avaliados para então seguir o processo de extração de RNA total e posterior análise de expressão de microRNA pela plataforma Nanostring (**Figura 13**).

Por fim, análises de bioinformática foram realizadas para avaliar o perfil de expressão dos miRNAs nos TCGs pediátricos.



Figura 13 - Fluxograma do projeto e atividades realizadas.

4.5 Considerações estatísticas

4.5.1 Tamanho da amostra

Foram incluídos portadores de câncer de tumores de células germinativas de ovário e testículo tratados no Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos. O número de amostra do estudo foi por conveniência totalizando 78 participantes, sendo 49 pacientes com tumor de ovário e 29 pacientes com tumor de testículo.

4.5.2 Análises estatísticas

O levantamento dos dados de interesse foi realizado por meio de ficha individual padronizada (**Anexo B**). Para registro e arquivo das informações, bem como o posterior processamento estatístico, foi criado um banco de dados específico em SPSS com os dados epidemiológicos, clínicos patológicos, de desfechos de resposta e de sobrevida. Inicialmente, os dados foram tabulados considerando as estatísticas descritivas para os dados quantitativos e as tabelas de frequência para as variáveis qualitativas.

Para avaliar os fatores clínicos associados à expressão dos miRNAs foi utilizado o teste *T Student* ou *Man-Whitney* após a verificação da normalidade que foi testada pelo teste *Kolmogorov-Smirnov*.

Todas estas análises foram realizadas utilizando no programa de software IBM-SPSS para Windows/Mac, versão 23.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA), conjuntamente com equipe de estatística e bioinformática do Hospital de Câncer de Barretos.

4.6 Extração e quantificação do RNA total em amostras de TCGs pediátricos

Um patologista especialista (<http://lattes.cnpq.br/2983357187517783>) em tumores da infância, em especial os tumores de células germinativas, analisou lâminas correspondentes aos blocos de parafina de um total de 49 de tumor de ovário e 29 tumores de testículo removidos em cirurgia para confirmação diagnóstica e classificação histológica. Ainda, outras 5 amostras-controle de tecido ovariano normal adjacente ao tumor e 5 amostras-controle de tecido testicular normal adjacente ao tumor foram também analisadas previamente.

Baseado em coloração com hematoxilina e eosina (H&E), as lâminas provenientes do bloco de parafina de cada tumor tiveram a área tumoral delimitada pelo patologista experiente para isolamento do material do tumor. Inicialmente, foi feito 1 corte de 5 micra em cada bloco de parafina para a coloração H&E com a finalidade de delimitar o tecido tumoral. Em seguida, foram realizados 5 cortes de 10 micra para utilização na extração do RNA e, ao final, novo corte de 5 micra corado em H&E para que o patologista pudesse avaliar a permanência de tumor nos cortes prévios.

Terminada a preparação de lâminas, foi realizada a macrodissecção do material para extração do RNA total utilizando o *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), conforme as informações do fabricante. Iniciou-se pela etapa de desparafinização, onde foi adicionado às amostras, 1 ml de xilol 100% (*Invitrogen, UK*), incubando por 5 minutos a 50°C com intuito de derreter a parafina, seguido de centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima para sedimentar todo o tecido. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se duas vezes com 1 ml de etanol absoluto para reidratação, seguido da centrifugação a vácuo por 10 minutos à 45°C para secagem dos *pellets*.

A próxima etapa foi necessária para que as proteínas ligadas ao material genético da amostra fossem degradadas. Assim, adicionou-se 200µl de tampão de digestão e 4µl de protease, mantendo a incubação por 3 horas a 50°C e 15 minutos a 80°C, à 500 rpm. Para evitar gotas de condensação que permaneçam no tubo ou tampa, o mix foi brevemente centrifugado (*spin*). Após, seguiu-se a etapa de isolamento e purificação de ácidos nucleicos

adicionando às amostras 240µL de aditivo de isolamento e 550µL de etanol 100% e com o tubo *Filter Cartridge* (fornecido pelo fabricante) foram centrifugados a 10.000 rpm por 30 segundos, para que o ácido nucleico ficasse ligado à coluna de sílica. A lavagem desta coluna de sílica foi realizada com solução Wash 1 e solução Wash 2, fornecidos pelo fabricante.

Como o material desejado era RNA, fez-se necessário a degradação do DNA. Dessa forma, adicionou-se 6µl de DNase buffer, 4µl de DNase e 50µl de água à amostra, que permaneceu incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. A coluna de sílica foi lavada com 700µl de Wash 1, incubada por mais 1 minuto em temperatura ambiente e nova centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm. Novamente fez-se a lavagem da coluna de sílica com 500µl de Wash 2 e centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm e realizou-se uma centrifugação adicional por 1 minuto a 10.000 rpm. Por fim, o RNA isolado foi eluído com 30µl de água ultrapura, incubado em temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado durante 1 minuto a 14.000 rpm.

A qualidade do RNA obtido foi avaliada utilizando o *NanoDrop® Spectrophotometer v3.7* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*), método de quantificação por espectrofotometria que captura o comprimento de onda emitido pela molécula (razões A260/A280 de 1.7–2.3 e A260/A230 de 1.8–2.3). O RNA extraído também foi quantificado por fluorimetria através do aparelho *Qubit 2.0* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA*), o qual quantifica o RNA com maior precisão. Em seguida, o material genético purificado foi armazenado em freezer a 80°C negativos.

O processo acima descrito, bem como suas etapas para a extração de RNA de parafina encontra-se como **Anexo C**.

4.7 Análise da expressão dos miRNAs

O RNA total extraído foi utilizado para análise de expressão dos miRNAs através do painel *Human v3 miRNA Assay CSO* (*CSO-MIR3-12, NanoString Technologies*). Este painel conta com a avaliação de 800 miRNAs distintos e conhecidos por estarem relacionados com o desenvolvimento e progressão do câncer.

O NanoString (*NanoString Technologies, Seattle, WA, EUA*) é um sistema automatizado o qual exige pouco tempo dedicado às atividades de bancada. Permite avaliar até 12 amostras simultaneamente e, de acordo com o painel escolhido, é possível analisar a expressão de

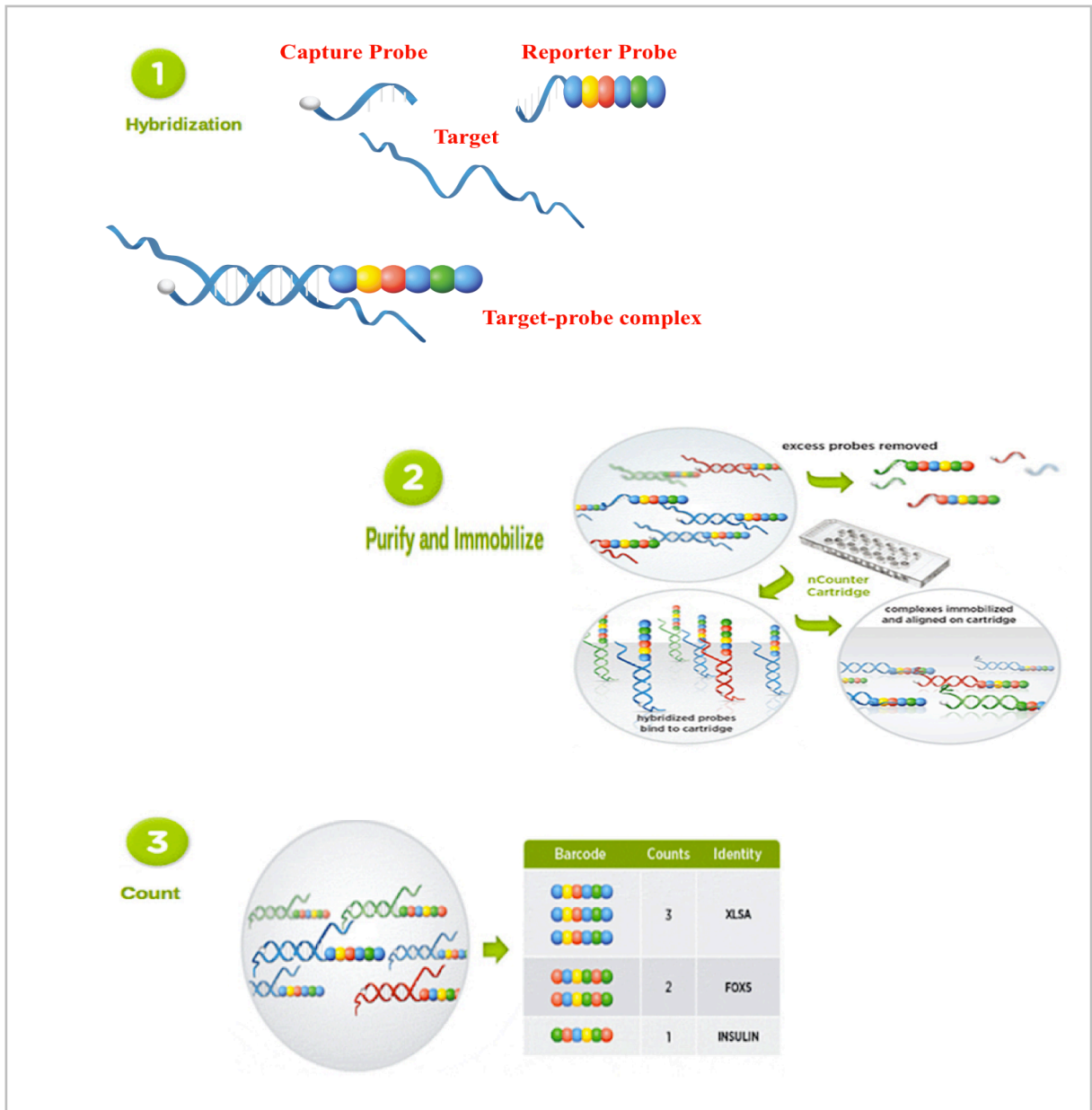
dezenas e até centenas de genes e miRNAs de interesse, bem como rearranjos/translocações e Variação no Número de Cópias de Segmentos de DNA (CNV) pela tecnologia nCounter^{®89}.

A tecnologia nCounter[®] (*NanoString Technologies*) para miRNAs conta com um código baseado em combinações de seis sequências com quatro cores distintas e que são denominadas de *barcodes* (do inglês, código de cores). Cada combinação de cor é equivalente a um miRNA distinto⁸⁹. Esta técnica apresenta algumas vantagens, incluindo i) é extremamente sensível sendo correspondente à PCR em tempo real e mais sensível que o método de microarranjos; ii) não necessita de reações enzimáticas e amplificação, dispensando a validação por outro método; iii) é capaz de detectar fragmentos pequenos provenientes de amostras com alto grau de degradação, incluindo amostras derivadas de tecido parafinado⁹⁰.

Para a análise de miRNAs é necessária a inclusão de uma etapa adicional denominada preparação das amostras. Essa preparação consiste na adição de uma *Tag* na extremidade 3' de cada um dos miRNAs analisados e nessas *Tags* as sondas poderão ser hibridizadas. Dessa forma, o painel nCounter *miRNA Expression Assay* contém 800 diferentes *Tags* para cada um dos miRNAs analisados. Na etapa de hibridização as duas sondas repórter e de captura foram hibridizadas nos respectivos miRNAs de interesse. A sonda repórter possui os códigos de cores em sua extremidade 5', ao passo que a sonda de captura possui biotina em sua extremidade 3', que foi imobilizado no cartucho por meio das *beads* magnéticas.

Após hibridização, o excesso de sondas nas amostras foi retirado usando o equipamento nCounter *PrepStation*⁸⁹ e a imobilização do complexo miRNA e sondas foi realizada através da sonda de captura que contém a biotina e as *beads* magnéticas contidas no cartucho. Nesse momento os complexos purificados foram eluídos e imobilizados no cartucho para a leitura dos dados.

A leitura de cada um dos códigos de cores presentes em cada poço do cartucho foi realizada no equipamento nCounter *Digital Analyzer*. Devido ao fato de cada código de cor ser correspondente a um miRNA específico, foi possível realizar a contagem absoluta de cada molécula presente nas amostras analisadas. Os resultados obtidos foram tabulados em formato RCC (*Reporter Code Count*) (**Figura 14**).



Fonte: Nanostring® web page⁸⁹

Figura 14 - Fluxograma da análise de miRNAs pela tecnologia nCounter® (NanoString Technologies).

4.8 Análise dos miRNAs diferencialmente expressos, processamento dos dados e controle de qualidade

Os valores brutos obtidos no equipamento *nCounter Digital Analyzer*, foram exportados em formato RCC para análise de bioinformática em ambiente estatístico-matemático R Studio (Rproject v3.6.6; *The R Foundation*, Viena, Áustria), utilizando um pacote de pré-processamento chamado *NanoStringNorm* que é um conjunto de ferramentas utilizadas para

pré-processar, executar diagnósticos e visualizar dados de expressão do Nanostring nCounter⁹¹. Para avaliar o desempenho geral do ensaio, foram utilizados os controles de qualidade do software *nSolver 3.0 (NanoString Technologies, Seattle, Washington, EUA)*, como *binding density*, *imaging QC*, bem como da linearidade de controles positivos e negativos⁸⁹.

Após esta avaliação de qualidade, os dados foram importados para uma planilha no formato *.xls (Extensible Style Language)*, contendo o *Code Class* e o *Accession*. O *Code Class* indica a classe de cada um dos controles e miRNAs analisados e o *Accession* se refere ao código de acesso desses controles e dos miRNAs presentes na reação com o objetivo de prosseguir com as avaliações de qualidade. Em seguida, os dados foram normalizados dentro do ambiente R Studio (R versão 3.6.6) utilizando um pacote chamado *Quantro package*. Este pacote auxilia na avaliação da qualidade do dado bruto, na observação de diferenças significativas de expressão entre os cartuchos, verificando, portanto, a existência dos chamados *Batches* de cartuchos (problemas técnicos relacionados aos cartuchos ou entre seus lotes) e não foi observado nenhum efeito no uso de diferentes lotes, demonstrando que os dados estão simétricos e com baixa dispersão (**Figura 15**).

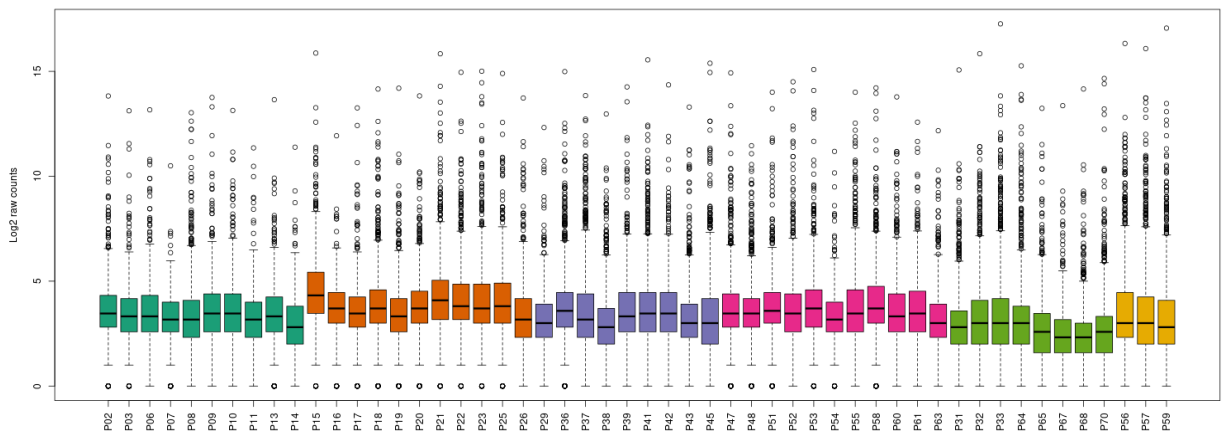


Figura 15 – Demonstração Bloxpot das amostras de pacientes pediátricos com TCG gonadal submetidas a análise por *Nanostring*.

Todas as amostras passaram pelo controle de qualidade técnica e apresentaram ausência de *flag*, ou seja, estavam dentro dos padrões de qualidade. Os passos de filtragem, normalização e análise de expressão diferencial foram executados no ambiente estatístico R

(R-project v3.6.1; *The R Foundation*, Viena, Áustria). Na inspeção dos controles de qualidade, as amostras foram avaliadas antes e após a normalização, utilizando o método *Quantile* (Figura 16 A e B).

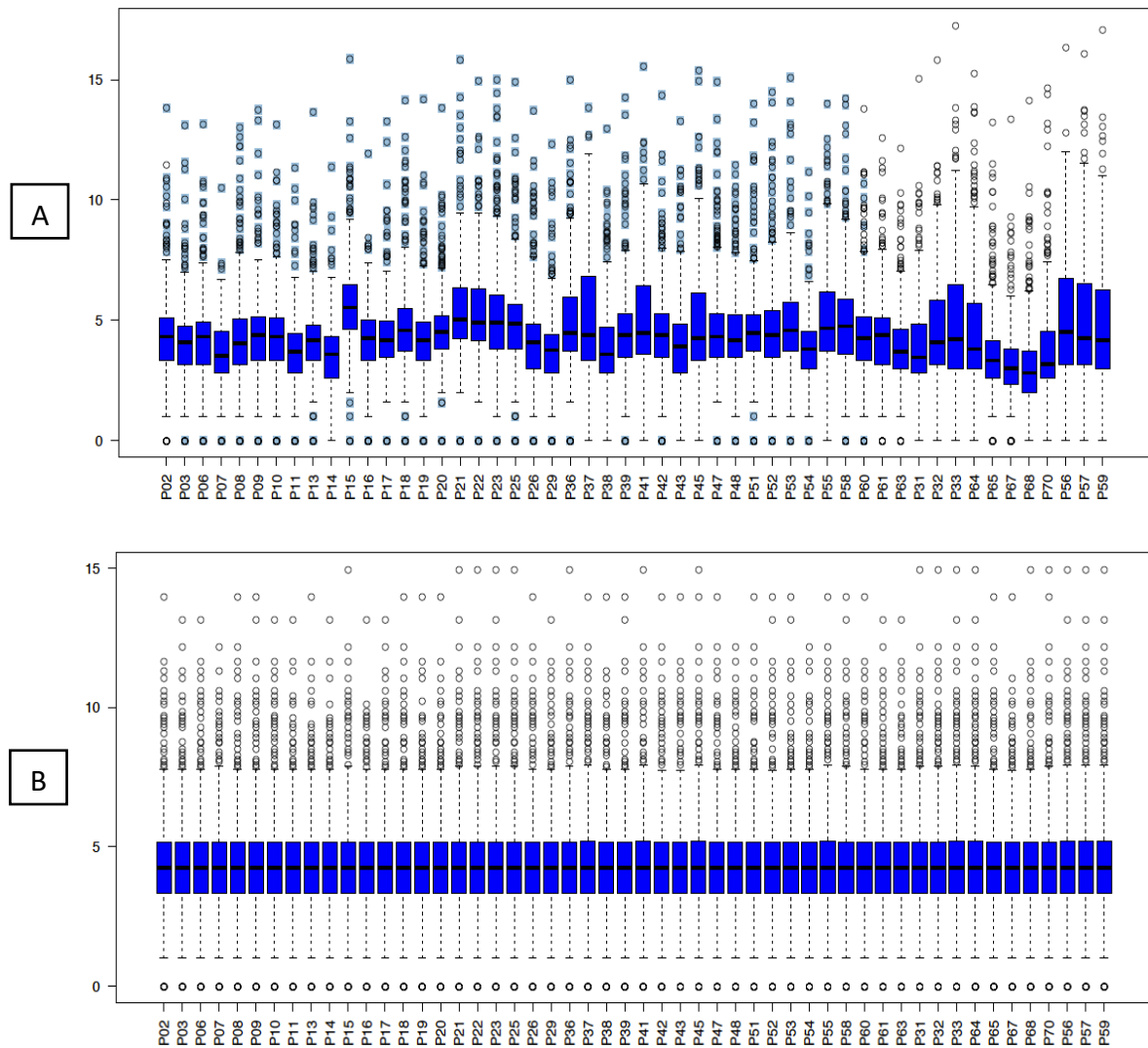


Figura 16 - Boxplots referentes à normalização dos dados das contagens de miRNAs das amostras de tecido normal e tumoral. A) Boxplot antes da normalização; B) Boxplot após a normalização com o método *Quantile*.

Posteriormente, foi realizada uma filtragem dos miRNA com baixa contagem considerando um valor de corte de 36 contagens, valor esse que corresponde a 5 vezes o desvio-padrão dos controles negativos diminuindo a chance de apresentar falso-positivos com contagens de miRNAs baixa. Foi observado que uma amostra (n° 69 = disgerminoma)

apresentou pequena quantidade na contagem de miRNAs e, portanto, foi excluída das análises.

Oitocentos microRNAs foram avaliados e filtrados utilizando nível de expressão acima do valor de corte: média + 5 desvios padrões (DP) dos controles negativos (36 contagens). Após a verificação de qualidade dos dados e filtragem, foram excluídos 401 miRNAs restando 399 miRNAs para serem analisados.

Foi utilizado o Teste T e análise de expressão diferencial utilizando *fold change* ≤ -2 e ≥ 2 . Para todas as análises foi considerado um valor de significância menor ou igual a 0,05. Foi realizada análise hierárquica não supervisionada gerando *Heatmaps*, a partir dos pacotes *ggplot2* e *ComplexHeatmap* (Bioconductor). A análise *t-distributed Stochastic Neighborhood Embedding* (t-SNE), baseada em agrupamento de amostras com perfis mais próximos, e também foi realizada. Essa abordagem foi proposta por Van Der Maaten & Hinton⁹², rapidamente se tornou uma ferramenta padrão em várias ciências naturais. O objetivo desta metodologia segundo o artigo de Van Der Maaten & Hinton (2014)⁹² é formar clusters bem separados e mais precisos⁹².

5 RESULTADOS

5.1 Análise descritiva da população de estudo e características clínicas

Um total de 78 pacientes com idade inferior a 19 anos e portadores de tumor de células germinativas gonadais foram tratados no Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos entre o período de janeiro de 2000 a dezembro de 2017. Destes pacientes, 49 possuíam tumores ovarianos e 29 tumores testiculares.

Após a análise *in loco* dos materiais acondicionados no setor da patologia do Hospital de Câncer de Barretos foram excluídos 22 pacientes que apresentavam mais de um componente histológico presente na peça. Esta decisão foi tomada em conjunto com equipe multiprofissional após intensa discussão a despeito da necessidade de microdissecção das lâminas com possibilidade de contaminação de mistura de tipos diferentes histopatológicos. Sendo assim, restaram 38 amostras de tumores ovarianos e 18 amostras de tumores testiculares. Cinco pacientes haviam sido submetidos a ressecção tumoral fora do serviço e foram excluídos pois no setor de arquivo de material biológico (condicionado em parafina) da patologia do Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos, não foi encontrado material tumoral disponível para análise. Ainda foram excluídos outros cinco pacientes pois o material encontrado para uso no estudo era proveniente de metástase fora das gônadas (ovário ou testículo).

Após a extração de RNA do material parafinado, três outros paciente foram excluídos por quantidade de RNA insuficiente e um último paciente excluído por contagem baixa de miRNA na amostra tumoral (utilizados 5 desvios-padrão que se refere a 36 contagens de miRNA), restando 42 pacientes (**Figura 17**).

Para as amostras-controle de tecido ovariano e testicular foi utilizado material adjacente ao TCG gonadal, uma vez que, no contexto pediátrico, são exíguas amostras de tecido gonadal normal. Assim, a casuística total finalizou com 42 pacientes, sendo 31 TCGs ovarianos e 11 TCGs testiculares, e 5 controles ovarianos normais e 5 controles testiculares normais, ambos adjacentes ao tumor.

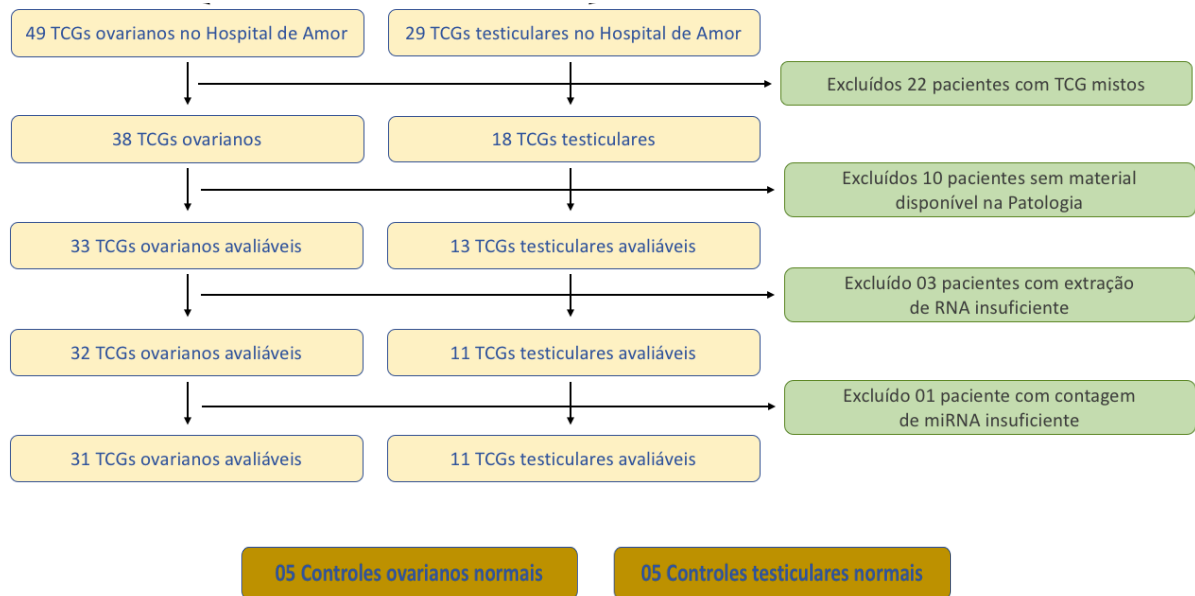


Figura 17 – Fluxo das amostras de pacientes pediátricos com TCGs gonadais incluídas no estudo.

Dentre os pacientes incluídos no estudo havia representantes de todas as regiões brasileiras, sendo a maioria provenientes do estado de São Paulo (46,7%), seguido por Minas Gerais (22,4%), Mato Grosso do Sul (6,7%), Rondônia, Roraima, Mato Grosso e Bahia (4,4%) e, por fim, Pará, Goiás e Paraná (2,2%).

Trinta e um por cento dos pacientes foram cadastrados no Protocolo Brasileiro para Tratamento de Tumores de Células Germinativas da Infância de 99, sendo 9 pacientes com tumor ovariano e 4 pacientes com tumor testicular e 69% cadastrados no Protocolo Brasileiro para Tratamento de Tumores de Células Germinativas da Infância de 2008, sendo 22 pacientes com tumor ovariano e 7 pacientes com tumor testicular. Cinquenta e nove por cento dos pacientes autoconsideravam-se brancos (ou seus responsáveis), 28% autoconsideravam-se pardo/mulato, negro/preto 6,5%, não havendo representantes dos indígenas e asiáticos e 6,5% não responderam a esta informação.

Tabela 8 - Características dos pacientes com TCG gonadal. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

Características	Total	Ovário	Testículo
N (%)	42 (100%)	31 (73,8%)	11 (26,2%)
Idade média (DP) em anos	11,8 (5,4)	14,1 (2,9)	5,4 (6,0)
Histologia			
Seio Endodérmico	11 (26,2%)	4 (13%)	7 (63,6%)
Carcinoma Embrionário	4 (9,5%)	2 (6,5%)	2 (18,2%)
Teratoma Ovariano Maduro	7 (16,7%)	7 (22,5%)	-
Teratoma Ovariano Imaturo	5 (11,9%)	5 (16%)	-
Grau de Morris I	1	1	
Grau de Morris II	2	2	
Grau de Morris III	2	2	
Teratoma Testicular Pré-Puberal	2 (4,7%)	-	2 (18,2%)
Teratoma Testicular Pós-Puberal	0	-	0 (0)
Disgerminoma/Seminoma	13 (31%)	13 (42%)	0 (0)
Estadiamento			
FIGO I	15	15 (48,3%)	-
FIGO II	4	4 (13%)	-
FIGO III	10	10 (32,2%)	-
FIGO IV	2	2 (6,5%)	-
COG I	13	5 (16,1%)	8 (72,8%)
COG II	12	11 (35,5%)	1 (9%)
COG III	13	13 (41,9%)	0 (0)
COG IV	4	2 (6,5%)	2 (18,2%)
Risco			
Baixo	21 (50%)	13 (41,9%)	8 (72,8%)
Intermédio	8 (19%)	7 (22,6%)	1 (9%)
Alto	13 (31%)	11 (35,5%)	2 (18,2%)
Metástase			
Sim	10 (23,8%)	7 (22,5%)	3 (27,3%)
Não	32 (76,2%)	24 (77,5%)	8 (72,7%)
Quimioterapia			
Sim	21 (50%)	18 (58%)	3 (27,3%)
Não	21 (50%)	13 (42%)	8 (72,7%)
Recidiva			
Sim	5 (12%)	2 (6,5%)	3 (27,3%)
Não	37 (88%)	29 (93,5%)	8 (72,7%)
Status			
Vivo sem doença	39 (92,8%)	29 (93,5%)	10 (91%)
Óbito por câncer	3 (7,2%)	2 (6,5%)	1 (9%)

Abreviações: DP, Desvio padrão; TCG, Tumor de célula germinativa.

A média de idade encontrada foi de 11,8 anos, sendo 14 anos nas meninas e 5 anos em meninos (**Tabela 8**). Dentre os pacientes com envolvimento ovariano, avaliando frequência por histologia observou-se que disgerminoma foi o mais frequente com 13 (42%) pacientes, seguido pelos teratomas (maduro 22,5% e imaturo 16% sendo um paciente grau I de Morris, dois pacientes grau II e dois pacientes grau III). Pela classificação da FIGO, quase metade dos pacientes foram alocados no estadio I (48,3% - 15 pacientes), e somente dois pacientes em estadio IV (6,5%) ao diagnóstico. Entretanto, quando transportamos estas pacientes para estadiamento proposto pelos grupos americano e europeu (CCG - POG) foi observado que o número de pacientes alocados no estadio I caiu para cinco (16,1%) aumentando as porcentagens dos estadios II (35,5%) e III (41,9%). Em relação ao risco, 13 pacientes (41,9%) ficaram classificados como baixo risco e 11 pacientes (35,5%) como alto risco, confirmando a prevalência maior nos estadios I, III e IV (**Tabela 8**).

Dentre os pacientes com tumor testicular, avaliando a frequência por histologia observou-se que seio endodérmico foi o mais frequente com sete pacientes (63,6%) não havendo representantes das histologias coriocarcinoma, seminoma e teratoma pós-puberal. Não houve pacientes no estadio III, sendo o de maior frequência estadio I com 72,8% (8 pacientes) e o estadio IV somente com dois pacientes (18,2%), sendo estes mesmos números referentes aos grupos de risco, baixo risco 72,8% (8 pacientes), risco intermédio 9% (1 paciente) e 18,2% (2 pacientes) alto risco (**Tabela 8**).

A maioria dos doentes não apresentava metástases ao diagnóstico (76,2% - 32 pacientes) e metade recebeu tratamento quimioterápico associado (**Tabela 8**). A maioria dos pacientes (88%) não apresentou recidiva tumoral e somente cinco pacientes (12%) apresentaram recidiva, sendo tumor de seio endodérmico, carcinoma embrionário, disgerminoma, teratoma imaturo e TCG misto as histologias encontradas nas amostras dos tumores ressecados após a recidiva (**Tabela 8**).

A maioria (92,8%) dos doentes encontra-se vivo e sem doença oncológica, e somente três (7,2%) dos 42 pacientes foram a óbito por câncer (**Tabela 8**). Dois deles de localização ovariana com 15 e 18 anos e o terceiro óbito, um bebê de seis meses com tumor testicular, todos com histologia tumor do seio endodérmico. Como a porcentagem de óbitos dentro da população de estudo foi baixa, não foi possível estimar a sobrevida pelo método de *Kaplan-Meier*.

Somente cinco pacientes, todos do sexo feminino, foram submetidos a biópsia da lesão por impossibilidade cirúrgica no momento do diagnóstico sendo a maioria submetida à ressecção completa (29 pacientes – 69%). Na população masculina 72,7% (8 pacientes) obtiveram a ressecção completa. A despeito da cirurgia, 29 pacientes (69%) foram submetidos à ressecção total do tumor gonadal, sendo 21 ooforectomias (67,8%) e 8 orquiectomias (72,7%) totais. Oito pacientes (19%) foram submetidos à ressecção parcial, sendo cinco ooforectomias (16,1%) e três orquiectomias (27,3%) parciais. Cinco pacientes (12%) foram submetidos somente à biópsia incisional, sendo todas biópsias ovarianas (16,1%).

Nem todos os pacientes tiveram dosagem dos marcadores tumorais, uma vez que, nestes protocolos, esta avaliação não era obrigatória (**Tabela 9**). Suas dosagens foram realizadas em maior porcentagem após a cirurgia, provavelmente quando se aventou a hipótese diagnóstica de TCG gonadal. Sendo assim, antes do procedimento cirúrgico, quase 40% dos pacientes não tiveram dosagens de AFP, mais de 30% de BHCG e mais de 40% de DHL.

Assim, pré-cirúrgico, 18 pacientes (42,9%) apresentavam dosagem de AFP normal e 8 pacientes aumentada (19%), sendo que destes, 2 eram mulheres e 6 homens. Em relação aos níveis de BHCG, 50% (21 pacientes) apresentavam em níveis normais e 16,7% (7 pacientes) aumentado, sendo estes 7 pacientes do sexo feminino. A dosagem da DHL se encontrava em valores aumentados em 8 pacientes (19%), sendo 7 pacientes do sexo feminino e somente um do sexo masculino (**Tabela 9**).

Tabela 9 – Marcadores tumorais séricos dos pacientes com TCG gonadal. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

Marcadores Tumorais	Total	Ovário	Testículo
AFP pré cirurgia			
Normal	18 (42,9%)	16 (51,6%)	2 (18,2%)
Aumentada	8 (19%)	2 (6,5%)	6 (54,5%)
Não Coletado	16 (38,1%)	13 (42%)	3 (27,3%)
BHCG pré cirurgia			
Normal	21 (50%)	13 (42%)	8 (72,7%)
Aumentada	7 (16,7%)	7 (22,5%)	0
Não Coletado	14 (33,3%)	11 (35,5%)	3 (27,3%)
DHL pré cirurgia			
Normal	17 (40,5%)	12 (38,7%)	5 (45,5%)
Aumentada	8 (19%)	7 (22,5%)	1 (9%)
Não Coletado	17 (40,5%)	12 (38,7%)	5 (45,5%)

Abreviações: TCG, Tumor de célula germinativa; AFP, Alfafetoproteína; BHCG, Fração beta da gonadotrofina coriônica; DHL, Desidrogenase láctica.

5.2 Análise dos microRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de ovário e testículo

Após a análise dos controles de qualidade, normalização dos dados e análise de expressão diferencial dos miRNAs, foi realizada uma análise hierárquica não supervisionada no programa estatístico-matemático R (*R-project v3.2.1; The R Foundation, Viena, Áustria*), na qual considerou-se *fold change* ≤ -2 e ≥ 2 e p valor ajustado $\leq 0,05$.

As análises foram realizadas com 42 amostras obtidas após os filtros de controle de qualidade, sendo 31 amostras de ovário e 11 de testículo, compondo o grupo tumoral. Ademais, como grupo controle foram utilizadas cinco amostras de tecido adjacente de ovário e cinco amostras de tecido adjacente de testículo.

Para analisar a expressão dos miRNAs em amostras de TCGs de ovário e testículo pediátricos, inicialmente o perfil de expressão dos miRNAs foi comparado entre as amostras de tumores de ovário com as amostras normais. As análises revelaram um dendrograma com dois agrupamentos distintos, separando as amostras de tecido normal e teratoma maduro e imaturo das amostras de tecido tumoral com componente histológico maligno (**Figura 18**). No primeiro agrupamento, a amostra do paciente P47 se agrupou com os tecidos normais. Isso pode ser justificado pelo fato de as células de teratoma serem normais, porém encontradas em lugar inadequado e assim podem expressar miRNAs em comum com as amostras do grupo controle. Ao mesmo tempo, esta amostra expressou quatro miRNAs (hsa-miR-200c-3p; hsa-miR-141-3p; hsa-miR-205-5p; hsa-miR-200b-3p) que também foram expressos nas demais amostras de teratoma maduro. Além da separação das amostras em dois agrupamentos distintos, é possível observar um conjunto de miRNAs específicos para os grupos controle, teratomas e um conjunto de miRNAs mais expressos em seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário, tais como os miRNAs da família hsa-miR-302, hsa-miR-367-3p, e hsa-miR-371~373.

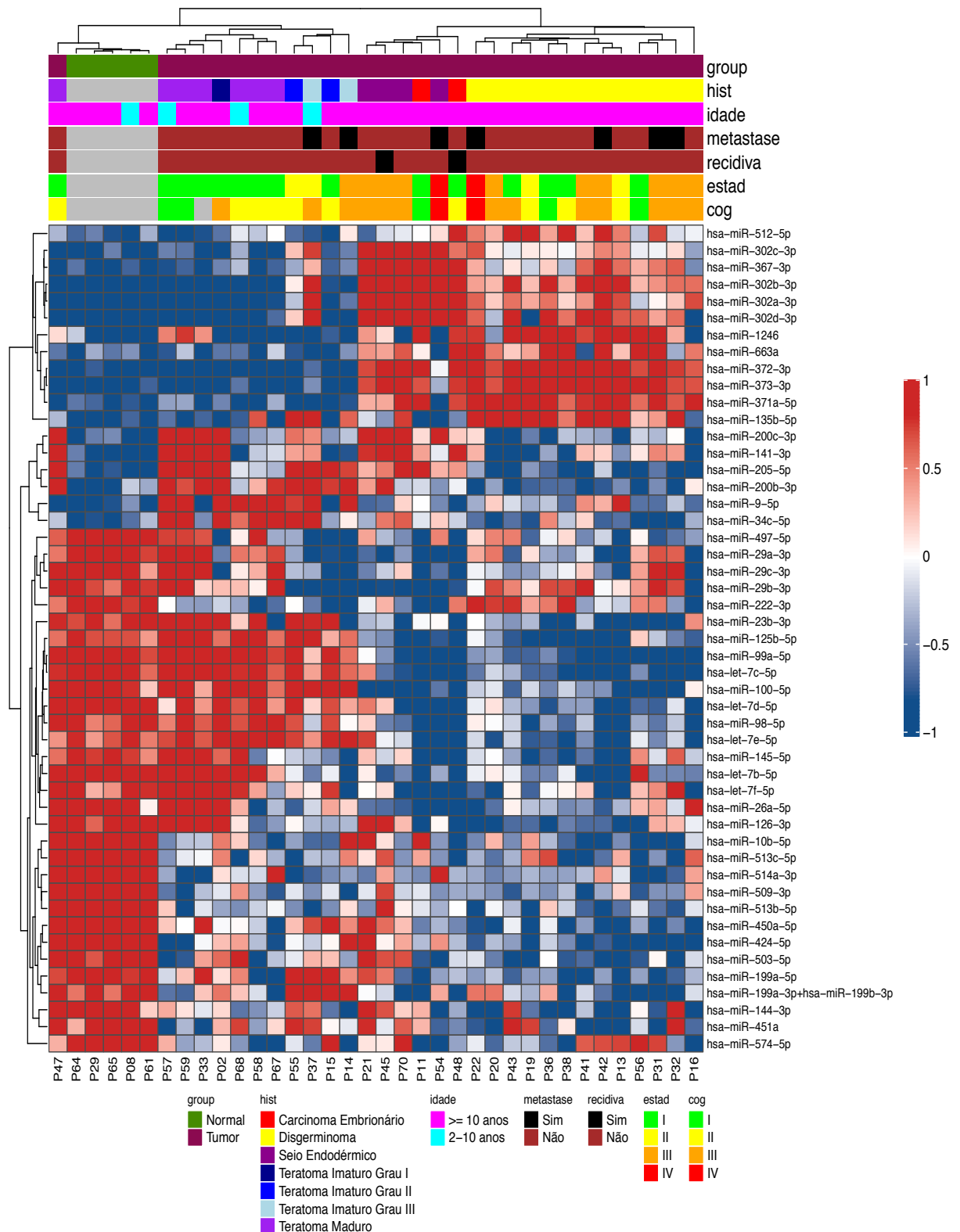


Figura 18 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras normais e tumorais de ovário. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*.

A comparação entre as amostras controle e tumorais de ovário mostraram 49 miRNAs diferencialmente expressos, dentre eles 18 estavam mais expressos e 31 estavam menos expressos no grupo dos tecidos tumorais. A **Tabela 10** descreve os 10 miRNAs mais e menos diferencialmente expressos nas análises entre tecido normal e tumoral ovariano. Foi observado que a família do hsa-miR-302, has-miR-1246, e o cluster hsa-miR-372/373 foram os mais expressos, ao passo que os hsa-miR-509-3p, hsa-miR-424-5p e hsa-miR-513b-5p foram os menos expressos nas amostras tumorais de ovário.

Ainda, um pequeno grupo de miRNAs apresentou alta expressão nas amostras de teratomas maduro e imaturo quando comparada com as amostras controles-normais, que inclui os microRNAs hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-9-5p e hsa-miR-34c-5p.

Tabela 10 - Lista dos top 10 miRNAs mais e menos expressos nas amostras de tecido tumoral de ovário comparado com tecido normal. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

miRNAs mais expressos		miRNAs menos expressos	
miRNA	<i>Log₂Fold Change</i>	miRNA	<i>Log₂Fold Change</i>
hsa-miR-302d-3p	5,3	hsa-miR-509-3p	-4,0
hsa-miR-302b-3p	4,8	hsa-miR-424-5p	-3,5
hsa-miR-1246	4,6	hsa-miR-513b-5p	-3,5
hsa-miR-372-3p	4,5	hsa-miR-99a-5p	-2,9
hsa-miR-373-3p	4,3	hsa-let-7c-5p	-2,6
hsa-miR-302a-3p	3,4	hsa-miR-513c-5p	-2,4
hsa-miR-367-3p	3,4	hsa-miR-514a-3p	-2,4
hsa-miR-205-5p	2,9	hsa-miR-145-5p	-2,2
hsa-miR-302c-3p	2,7	hsa-miR-450a-5p	-2,2
hsa-miR-9-5p	2,2	hsa-miR-199a-5p	-2,0

Abreviações: miRNA, microRNA; miRNAs, microRNAs.

Após a análise do perfil de expressão dos miRNAs entre tumores de ovário e as amostras normais, foi comparado o perfil de expressão dos miRNAs entre as amostras controle e tumorais de testículo. Essa análise resultou em 51 miRNAs diferencialmente expressos, dentre

eles, 23 estavam mais expressos e 28 estavam menos expressos no grupo dos tecidos tumorais. Assim como nos resultados das análises de ovário, observou-se um dendrograma com dois agrupamentos distintos, separando as amostras de tecido normal e teratoma pré-púbere das amostras de tecido tumoral com componente histológico maligno (**Figura 19**). Vinte e três miRNAs apresentaram maior expressão nos tecidos tumorais em relação aos controles normais, incluindo hsa-miR-93-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302a-5p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-371a-5p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-543, hsa-miR-1915-3p, hsa-miR-4488, hsa-miR-4516, e hsa-miR-4532.

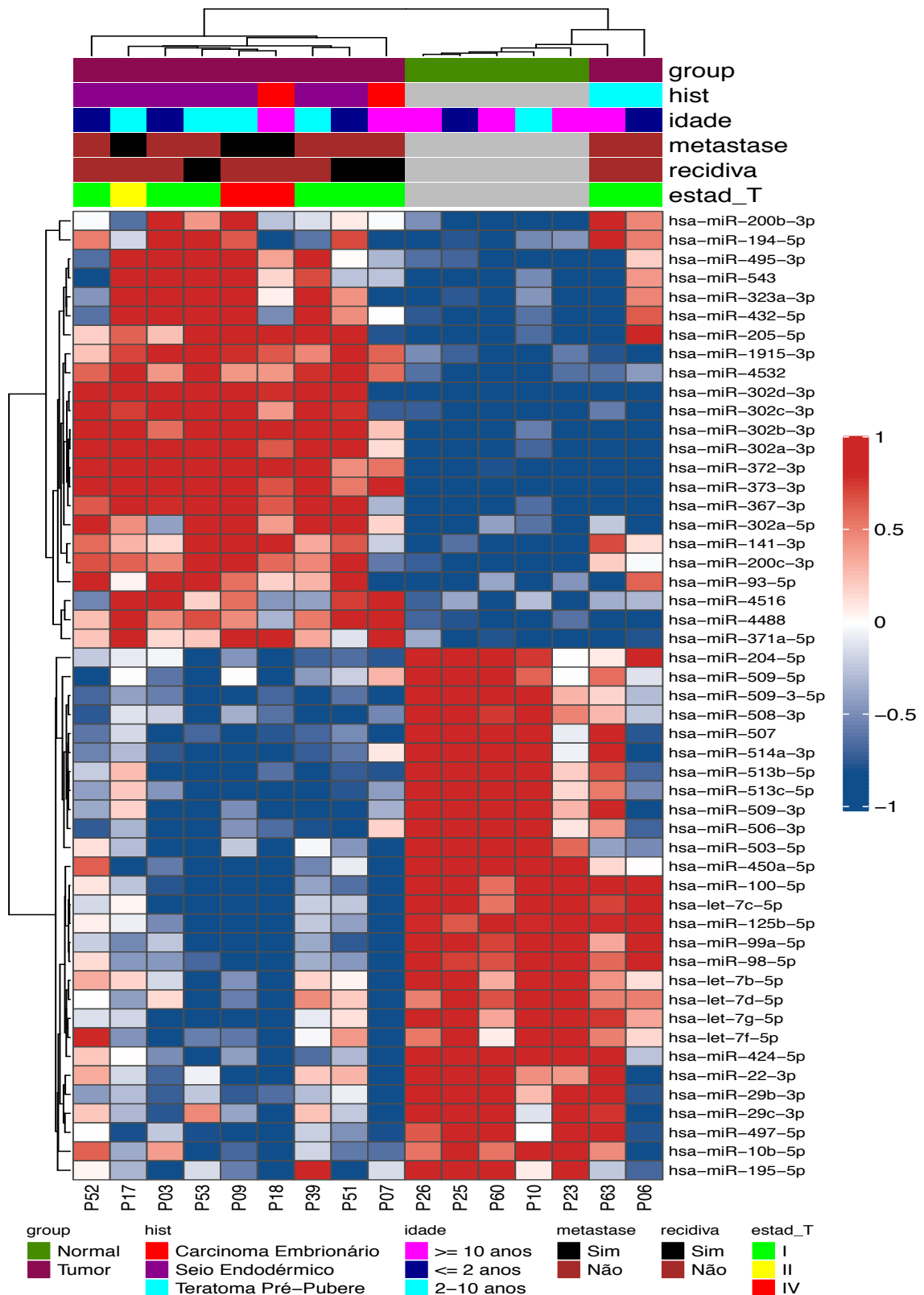


Figura 19 - Perfil de expressão dos miRNAs foi comparado entre as amostras normais e tumorais de testículo. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*.

Foram selecionados os 10 miRNAs mais e menos diferencialmente expressos nas análises entre tecido normal e tumoral testicular (**Tabela 11**). Assim, nas análises de ovário, a família do hsa-miR-302 e o cluster hsa-miR-372/373 foram os mais expressos, ao passo que os hsa-miR-508-3p, hsa-miR-509-3p, e hsa-miR-513b/c-5p foram os menos expressos nas amostras tumorais de testículo em relação aos controles normais.

Tabela 11 - Lista dos top 10 miRNAs mais e menos expressos nas amostras de tecido tumoral de testículo comparado com tecido normal. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

miRNAs mais expressos		miRNAs menos expressos	
miRNA	<i>Log₂ Fold Change</i>	miRNA	<i>Log₂ Fold Change</i>
hsa-miR-302d-3p	7,9	hsa-miR-508-3p	-5,9
hsa-miR-302b-3p	7,4	hsa-miR-509-3p	-5,7
hsa-miR-302a-3p	5,5	hsa-miR-513b-5p	-5,3
hsa-miR-302c-3p	5,1	hsa-miR-513c-5p	-4,9
hsa-miR-372-3p	4,9	hsa-miR-514a-3p	-4,2
hsa-miR-373-3p	4,9	hsa-miR-507	-3,8
hsa-miR-367-3p	3,9	hsa-miR-509-3-5p	-3,5
hsa-miR-205-5p	3,5	hsa-miR-506-3p	-3,4
hsa-miR-200c-3p	3,2	hsa-miR-424-5p	-3,3
hsa-miR-141-3p	2,5	hsa-miR-125b-5p	-3,2

Abreviações: miRNA, microRNA; miRNAs, microRNAs.

5.3 Intersecção das análises de tumores de ovário e testículo

O número de miRNAs em comum referente às comparações de tumor de testículo e ovário com o grupo de tecido normal está representado no Diagrama de Venn na **Figura 20**. Trinta e um microRNAs foram observados na intersecção entre os tumores de testículo e ovário, sendo 12 superexpressos e 19 menos expressos no tecido tumoral comparado com normal (**Tabela 12**).

Dentre os miRNAs superexpressos destacam-se os miRNAs da família hsa-miR-302, hsa-miR-371~373, hsa-miR-367, hsa-miR-205, hsa-miR-200, e hsa-miR-141 e dentre os menos expressos destacam-se os miRNAs, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-513b/c-5p, hsa-miR-514a-3p, hsa-miR-424-5p e hsa-miR-125b-5p. Ainda, 20 miRNAs foram exclusivos dos tumores de testículo e 18 dos tumores de ovário (**Tabela 13**).

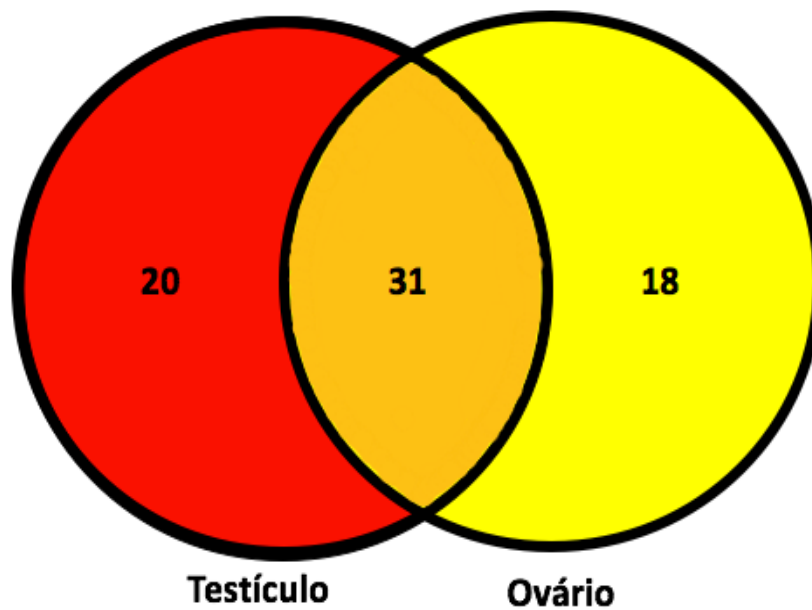


Figura 20 - Diagrama de Venn. Representação do número de miRNAs diferencialmente expressos entre as diferentes análises (Normal vs. Tumor de Testículo; Normal vs. Tumor de Ovário). O número intergráfico representa o número de miRNAs diferencialmente expressos em comum entre dois grupos.

Tabela 12 – Lista dos 31 miRNAs diferencialmente expressos em comum entre os tumores de testículo e ovário, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

miRNAs	Testículo	Ovário
	<i>Log₂ Fold Change</i>	<i>Log₂ Fold Change</i>
hsa-miR-302d-3p	7,9	5,3
hsa-miR-302b-3p	7,4	4,8
hsa-miR-302a-3p	5,5	3,4
hsa-miR-302c-3p	5,1	2,7
hsa-miR-372-3p	4,9	4,5
hsa-miR-373-3p	4,9	4,3
hsa-miR-367-3p	3,9	3,4
hsa-miR-205-5p	3,5	2,9
hsa-miR-200c-3p	3,2	1,8
hsa-miR-141-3p	2,5	1,2
hsa-miR-200b-3p	1,6	1,1
hsa-miR-371a-5p	1,6	2,0
hsa-let-7f-5p	-1,3	-1,2
hsa-miR-10b-5p	-1,3	-1,9
hsa-miR-98-5p	-1,4	-1,1
hsa-miR-497-5p	-1,5	-1,8
hsa-let-7d-5p	-1,7	-1,3
hsa-miR-503-5p	-1,7	-1,8
hsa-miR-29c-3p	-1,9	-1,6
hsa-miR-100-5p	-2,3	-1,3
hsa-miR-450a-5p	-2,4	-2,2
hsa-let-7b-5p	-2,6	-1,3
hsa-miR-29b-3p	-2,8	-1,3
hsa-let-7c-5p	-2,9	-2,6
hsa-miR-99a-5p	-3,1	-2,9
hsa-miR-125b-5p	-3,2	-1,8
hsa-miR-424-5p	-3,3	-3,5
hsa-miR-514a-3p	-4,2	-2,4
hsa-miR-513c-5p	-4,9	-2,4
hsa-miR-513b-5p	-5,3	-3,5
hsa-miR-509-3p	-5,7	-4,0

Abreviações: miRNAs, microRNAs.

Tabela 13 – Lista dos 20 miRNAs diferencialmente expressos nos tumores de testículo e 18 miRNAs nos ovários comparados com tecido normal, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

Testículo		Ovário	
miRNAs	<i>Log₂ Fold Change</i>	miRNAs	<i>Log₂ Fold Change</i>
hsa-miR-1915-3p	2,0	hsa-miR-1246	4,6
hsa-miR-302a-5p	1,9	hsa-miR-9-5p	2,2
hsa-miR-194-5p	1,8	hsa-miR-135b-5p	2,1
hsa-miR-4488	1,8	hsa-miR-34c-5p	1,5
hsa-miR-323a-3p	1,7	hsa-miR-663a	1,2
hsa-miR-4532	1,7	hsa-miR-512-5p	1,0
hsa-miR-4516	1,6	hsa-let-7e-5p	-1,0
hsa-miR-93-5p	1,4	hsa-miR-574-5p	-1,0
hsa-miR-432-5p	1,3	hsa-miR-126-3p	-1,1
hsa-miR-495-3p	1,1	hsa-miR-23b-3p	-1,1
hsa-miR-543	1,0	hsa-miR-26a-5p	-1,4
		hsa-miR-199a-3p+hsa-	
hsa-miR-22-3p	-1,3	miR-199b-3p	-1,5
hsa-miR-195-5p	-1,5	hsa-miR-144-3p	-1,6
hsa-miR-509-5p	-2,0	hsa-miR-222-3p	-1,9
hsa-let-7g-5p	-2,1	hsa-miR-29a-3p	-1,9
hsa-miR-204-5p	-2,3	hsa-miR-451a	-1,9
hsa-miR-506-3p	-3,4	hsa-miR-199a-5p	-2,0
hsa-miR-509-3-5p	-3,5	hsa-miR-145-5p	-2,2
hsa-miR-507	-3,8		
hsa-miR-508-3p	-5,9		

Abreviações: miRNAs, microRNAs.

5.4 Análise dos microRNAs diferencialmente expressos entre tecido tumoral e normal

Foi realizada a comparação entre as amostras do grupo normal (ovário: n= 5; testículo: n=5) com o grupo tumoral (ovário: n= 31; testículo: n=11). Na **Figura 21**, nota-se que seis miRNAs (hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-

miR-373-3p e hsa-miR-302c-3p) estavam superexpressos nas amostras tumorais em relação as amostras de tecido normal. Por outro lado, os hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-450a-5p e let-7d-5p foram pouco expressos nas amostras tumorais em relação às amostras de tecido normal.

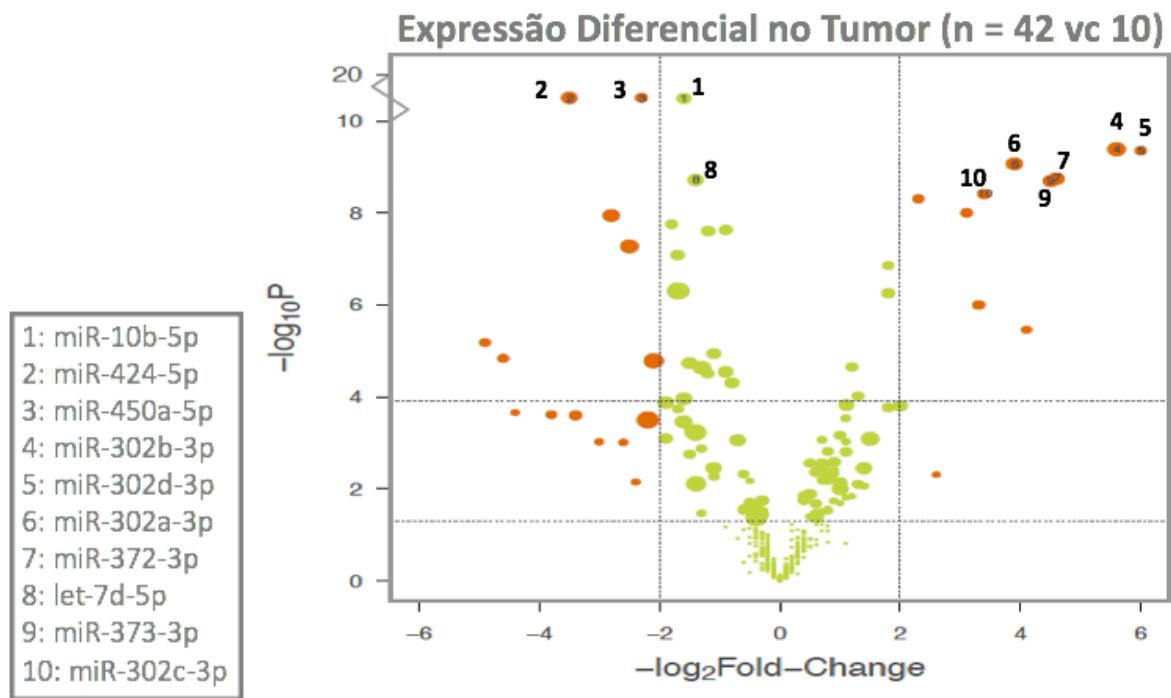


Figura 21 - *Volcano plot* da expressão dos miRNAs entre os grupos normais e tumorais, usando a tecnologia do painel *nCounter® miRNA Expression Assay*. A barra vertical representa o valor da expressão gênica ($\log_2 fold change$) e a barra horizontal a significância, inferior $P=0,05$ e superior $P=0,05$ ajustado. Os miRNAs que aparecem acima da linha horizontal e à esquerda vertical exibem baixa expressão ($\log_2 fold change \leq 2$), os que aparecem acima da linha horizontal e à direita da linha vertical demonstram superexpressão ($\log_2 fold change \geq 2$). O tamanho dos pontos dos miRNAs está relacionado com os valores de $\log_2 fold changes$. O gráfico é construído em logarítmico para que se obtenha a forma apresentada.

As similaridades e diferenças entre o perfil de expressão dos miRNAs nas amostras normal e tumoral foram analisadas através do agrupamento hierárquico. Igualmente as análises anteriores revelaram um dendrograma com dois agrupamentos distintos, separando as amostras de tecido normal e teratoma maduro e imaturo das amostras de tecido tumoral

com componente histológico maligno (**Figura 22**). Ainda, no primeiro agrupamento duas amostras tumorais se agrupam com os tecidos normais, as amostras P47 (Teratoma maduro de ovário) e P63 (Teratoma Pré-púbere). Isto pode ser justificado pela semelhança entre teratomas e tecidos normais, uma vez que teratomas são células normais que se encontram em local inapropriado. Sendo assim, podem apresentar perfil de expressão semelhantes aos mesmos.

Nesta análise, nota-se que os teratomas imaturos graus II e III se agrupam e os teratomas maduros se agrupam com uma única amostra de teratoma imaturo grau I. Dentre os teratomas imaturos, a classificação por grau (I, II ou III)⁹³ é feita com base nas quantidades relativas de componente neuroectodérmico imaturo. Norris, Zirkin e Benson em 1975⁹³ já chamavam atenção para a capacidade de metastatização dos teratomas imaturos, particularmente o que é observado na clínica. A única amostra de teratoma imaturo grau I que se agrupou com os teratomas maduros é justificada pelo fato de a quantidade de tecido neuroglial ser menor e o restante é basicamente o que é encontrado nos teratomas maduros, enquanto os graus II e III com maior quantidade deste tecido apresentar-se-iam diferentes.

A expressão dos miRNAs hsa-miR-431-5p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-141-3p e hsa-miR-200b-3p está aumentada em teratomas, bem como em algumas amostras de carcinomas embrionários e seio endodérmico. Isso pode ser explicado pela patologia pois a WHO define que componente mais primitivo do teratoma imaturo são corpos embrióides constituídos por epitélio do saco vitelino e um disco germinativo cujo epitélio se assemelha ao do carcinoma embrionário (tumores compostos predominantemente por corpos embrióides foram denominados poliembrioma)²². Além disso, alguns miRNAs (hsa-let-7e-5p, hsa-let-7d-5p, hsa-miR-98-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-125b-5p) foram mais expressos em tecidos normais, teratomas imaturos e maduros comparados com as demais histologias, corroborando mais uma vez a patologia com formas celulares presentes em ambas as classificações histopatológicas. Ainda, uma amostra (P48) se agrupou com as amostras de carcinoma embrionário, entretanto, nenhuma justificativa foi encontrada para esse fato.

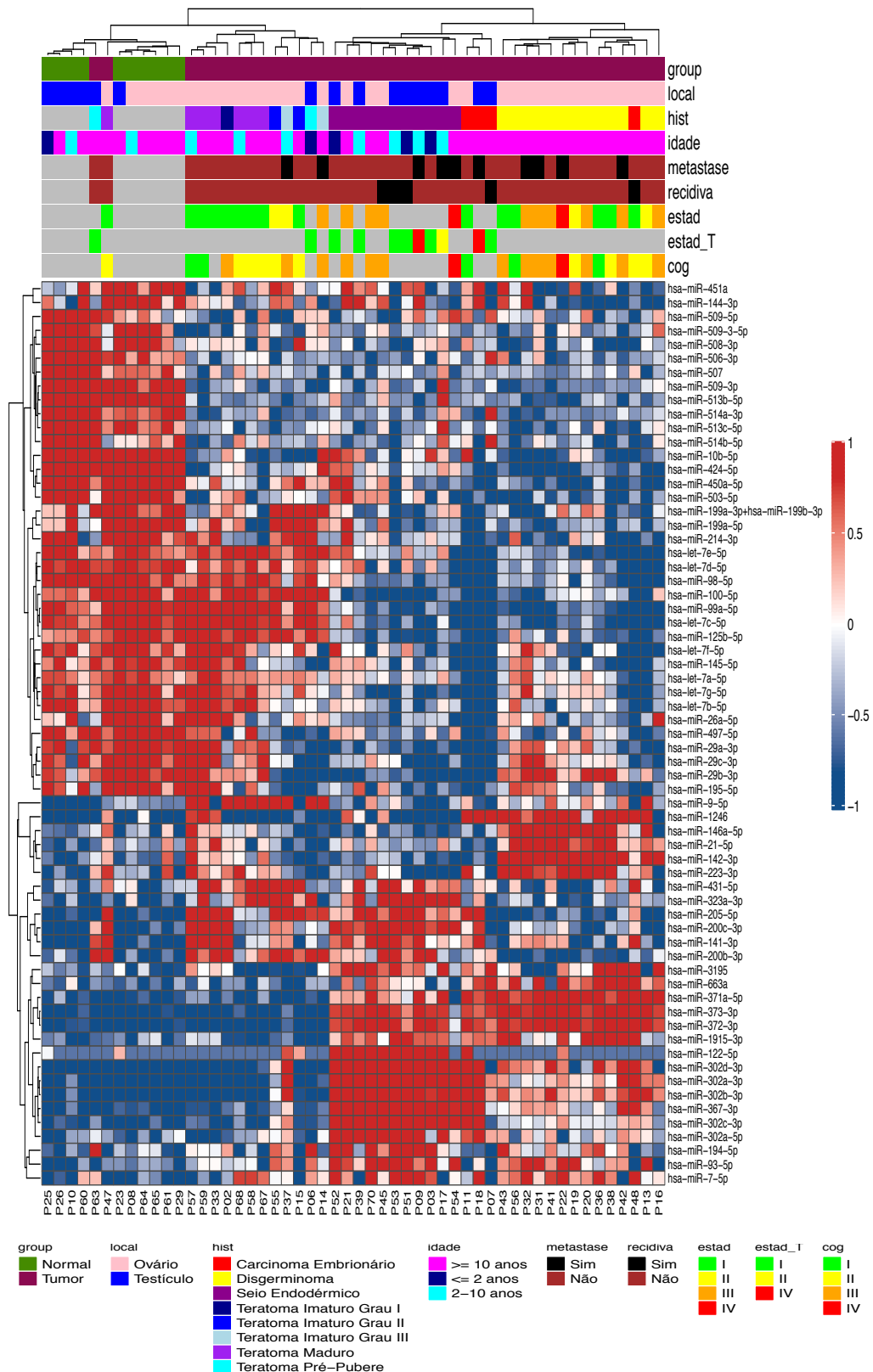


Figura 22 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras normais e tumorais. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*.

Na análise comparativa entre amostras normais e tumorais observaram-se 65 miRNAs diferencialmente expressos, nos quais 28 miRNAs estavam mais expressos e 37 estavam menos expressos no grupo tumoral. Selecionando os 10 miRNAs mais expressos dentre os 28 miRNAs destacam-se miR-302d-3p, miR-302b-3p, miR-372-3p, miR-373-3p, miR-1246, miR-302a-3p, miR-302c-3p, miR-367-3p, miR-205-5p e miR-122-5p. Selecionando os 10 miRNAs menos expressos dentre os 37 miRNAs destacam-se miR-509-3p, miR-513b-5p, miR-508-3p, miR-513c-5p, miR-424-5p, miR-514a-3p, miR-507, miR-99a-5p, miR-506-3p e let-7c-5p.

Para confirmar que os miRNAs eram capazes de distinguir as amostras normais e tumorais, foi realizada análise com abordagem t-SNE, que permite a visualização dos dados através da redução de dimensionalidade (**Figura 23**). As amostras tumorais de disgerminoma, carcinoma embrionário e seio endodérmico mostraram maior separação das amostras normais quando comparadas aos teratomas maduros e imaturos.

Portanto, as análises evidenciaram que embora diversos fatores influenciam na separação das amostras pela expressão de miRNAs, a histologia celular é o fator mais importante e responsável pela *clusterização* das amostras.

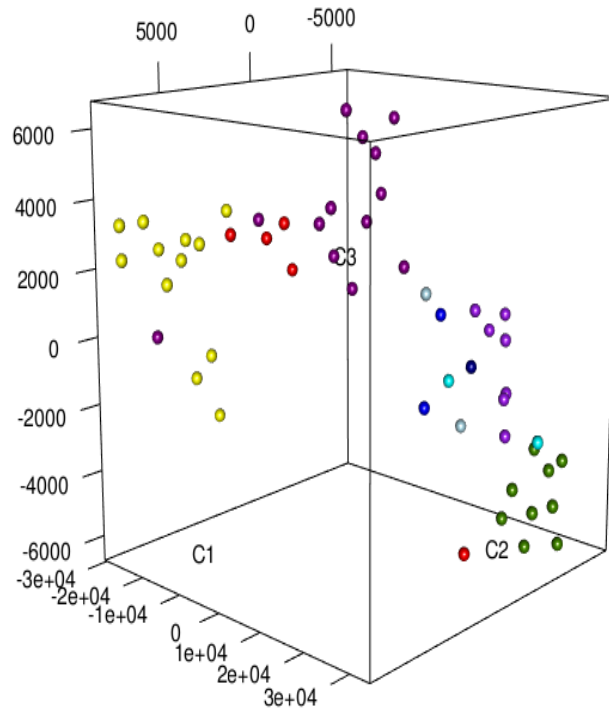


Figura 23 - Análise de *t-distributed Stochastic Neighborhood Embedding* (t-SNE) para determinar as amostras normais *versus* tumorais. Os pontos em amarelo indicam as amostras de disgerminoma, pontos vermelhos, o carcinoma embrionário, pontos em roxo, o seio endodérmico, pontos em lilás, teratoma maduro, pontos azuis, o teratoma imaturo e pontos verdes, amostras normais.

5.5 Análise dos microRNAs diferencialmente expressos entre as amostras tumorais malignas

Com o objetivo de melhor caracterizar as diferenças entre os perfis de expressão dos miRNAs de cada tumor maligno, foi realizada uma análise considerando as amostras de seio endodérmico, carcinoma embrionário, disgerminoma e teratoma imaturo, em ambas as localizações (ovário e testículo). Após nova análise dos controles de qualidade, normalização dos dados e análise de expressão diferencial dos miRNAs, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), considerando os parâmetros de *fold change* ≤ -2 e ≥ 2 e *p* valor ajustado $\leq 0,05$ para seleção dos miRNAs diferencialmente expressos. O dendrograma revelou quatro agrupamentos distintos, separando os tumores de acordo com a histologia (**Figura 24**).

Foram identificados 39 miRNAs com a expressão diferenciada entre os tumores malignos, sendo que cada histologia apresentou um grupo de miRNAs mais expressos específicos.

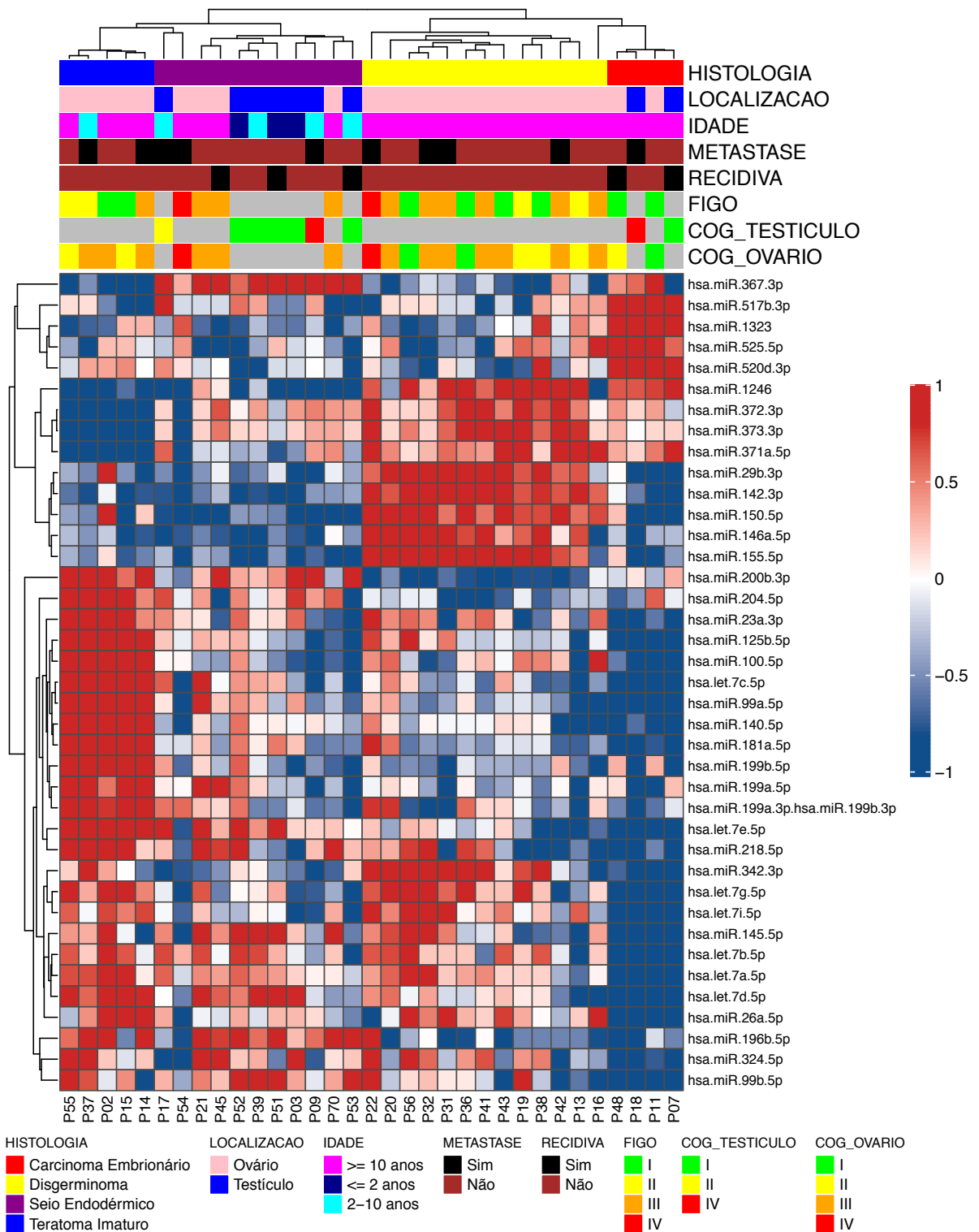


Figura 24 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras tumorais malignas, incluindo carcinoma embrionário, disgerminoma, seio endodérmico e teratoma imaturo. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*.

5.6 Intersecção das análises dos microRNAs diferencialmente expressos entre as amostras tumorais malignas

Para entender e caracterizar os perfis de expressão dos miRNAs entre os quatro tipos histológicos malignos, foi confeccionado um diagrama de Venn capaz de mostrar a relação de pertinência, intersecção e diferença entre os conjuntos de miRNAs (**Figura 25**). Para a realização do diagrama de Venn foram utilizados os dados das análises comparativas entre o determinado tipo histológico com o tecido normal.

As análises revelaram 132 miRNAs diferencialmente expressos nos quatro tipos histológicos malignos, nos quais os números de miRNAs descritos nas intersecções informam quantos miRNAs aparecem diferencialmente expressos. Por exemplo, existe apenas um miRNA (hsa-miR-205-5p) diferencialmente expresso em tumor de seio endodérmico e teratoma imaturo. Avaliando a intersecção entre as histologias carcinoma embrionário e disgerminoma observaram-se quatro miRNAs diferencialmente expressos (hsa-miR-1246, hsa-miR-135a-5p, hsa-miR-140-5p e hsa-miR-342-3p) e 17 miRNAs diferencialmente expressos entre as histologias disgerminoma e seio endodérmico (hsa-let-7b-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-130a-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-1915-3p, hsa-miR-194-5p, hsa-miR-199a-3p+hsa-miR-199b-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-514b-5p, hsa-miR-596, hsa-miR-7-5p e hsa-miR-93-5p). Considerando a intersecção entre três histologias foi observado somente um miRNA (hsa-miR-200b-3p) em comum entre seio endodérmico, teratoma imaturo e carcinoma embrionário e 26 miRNAs entre as histologias seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário.

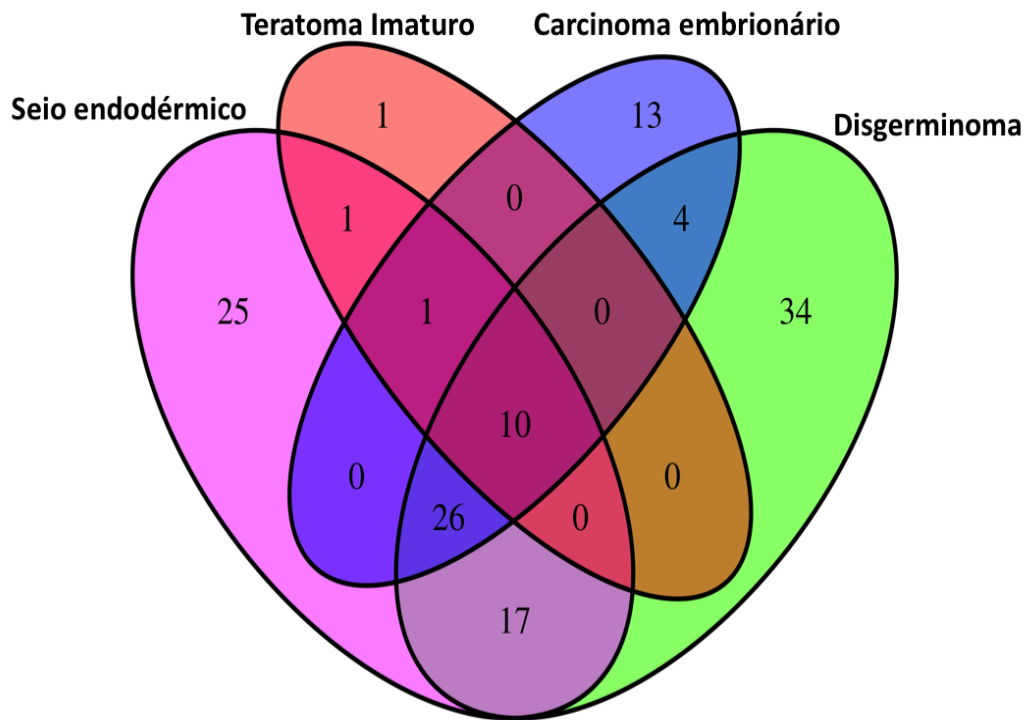


Figura 25 - Diagrama de Venn. Representação do número de miRNAs diferencialmente expressos entre as diferentes análises (Normal vs. carcinoma embrionário; Normal vs. disgerminoma; Normal vs. seio endodérmico e Normal vs. teratoma imaturo). O número intergráfico representa o número de miRNAs diferencialmente expressos em comum entre os grupos.

Por fim, na intersecção central entre todos os tumores malignos foram observados 10 microRNAs, sendo estes descritos na **Tabela 14**. Nota-se que todos os miRNAs apresentaram expressão diminuída nos tumores malignos comparados com os tecidos normais.

Tabela 14 – Lista dos 10 miRNAs diferencialmente expressos em comum entre todos os tumores malignos carcinoma embrionário, disgerminoma, seio endodérmico e teratoma imaturo, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

miRNAs	Seio Endodérmico		Disgerminoma		Carcinoma Embrionário		Teratoma Imaturo	
	<i>p_adj</i>	<i>Log2 Fold Change</i>	<i>p_adj</i>	<i>Log2 Fold Change</i>	<i>p_adj</i>	<i>Log2 Fold Change</i>	<i>p_adj</i>	<i>Log2 Fold Change</i>
hsa-miR-195-5p	0,0013	-1,9	0,0042	-1,5	0,0069	-3,0	0,0076	-2,0
hsa-miR-29a-3p	0,00072	-2,5	0,013	-1,6	0,00077	-3,2	0,0069	-2,4
hsa-miR-497-5p	0,000015	-1,6	5,7E-06	-1,6	0,017	-2,9	0,0013	-2,7
hsa-miR-503-5p	0,00036	-1,5	6,3E-08	-2,2	0,000011	-2,2	0,0013	-1,7
hsa-miR-506-3p	0,0018	-2,9	0,005	-2,6	0,049	-2,4	0,031	-2,8
hsa-miR-507	0,0025	-3,2	0,0021	-3,2	0,014	-2,8	0,044	-3,5
hsa-miR-509-3p	0,000089	-4,9	0,000049	-5,2	0,00027	-5,0	0,0013	-5,4
hsa-miR-513b-5p	0,00025	-4,4	0,000038	-5,0	0,00041	-4,5	0,00084	-5,2
hsa-miR-513c-5p	0,003	-3,5	0,00068	-4,2	0,005	-3,9	0,01	-4,0
hsa-miR-514a-3p	0,0023	-3,3	0,00098	-3,6	0,04	-3,3	0,0038	-3,9

Abreviações: miRNAs, microRNAs.

5.6.1 Análise de expressão dos microRNAs comuns entre os tipos histológicos seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário

Analisando a expressão de microRNAs diferencialmente expressos em comum entre os tumores malignos de seio endodérmico, disgerminoma, e carcinoma embrionário comparados com amostras-controle de testículo e ovário, foi observado um total de 26 microRNAs. Destes, 20 microRNAs foram superexpressos em amostras de controle normal e seis foram mais expressos nos tecidos tumorais (**Tabela 15**), sendo esses seis miRNAs os hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-367-3p e hsa-miR-371a-5p.

Tabela 15 – Lista dos 26 miRNAs diferencialmente expressos em comum entre os tumores de seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

miRNAs	Seio endodérmico		Disgerminoma		Carcinoma embrionário	
	<i>p_adj</i>	<i>Log2 Fold Change</i>	<i>p_adj</i>	<i>Log2 Fold Change</i>	<i>p_adj</i>	<i>Log2 Fold Change</i>
hsa-miR-302b-3p	5,2E-11	9,3	9,9E-09	6,4	0,003	7,9
hsa-miR-302a-3p	1,6E-10	7,5	2,5E-08	3,8	0,006	6,1
hsa-miR-372-3p	2E-08	6,5	4,8E-15	7,5	0,00027	6,6
hsa-miR-373-3p	2,6E-07	6,0	4,8E-15	7,5	0,0000001	6,4
hsa-miR-367-3p	1,6E-10	5,8	1,3E-05	2,6	0,049	4,9
hsa-miR-371a-5p	0,0014	1,8	1,5E-10	3,5	0,0012	3,3
hsa-let-7e-5p	0,0046	-1,0	1,1E-05	-1,9	0,003	-3,5
hsa-miR-27b-3p	0,00034	-1,0	1,1E-05	-1,3	0,0031	-2,0
hsa-miR-214-3p	0,011	-1,1	0,0015	-1,7	0,006	-2,6
hsa-let-7d-5p	0,00059	-1,3	6,3E-08	-1,7	0,025	-3,8
hsa-let-7f-5p	0,0021	-1,3	0,00086	-1,4	0,0000011	-3,1
hsa-miR-98-5p	3,3E-06	-1,4	1,4E-05	-1,6	0,0000038	-2,6
hsa-miR-26a-5p	0,0023	-1,5	0,025	-1,0	0,0028	-3,0
hsa-miR-29c-3p	0,0013	-1,7	0,041	-1,0	0,00052	-3,9
hsa-miR-145-5p	0,0021	-1,9	0,00048	-2,2	0,0014	-4,8
hsa-let-7a-5p	0,00048	-2,0	0,0041	-1,8	0,035	-10
hsa-miR-450a-5p	8,9E-05	-2,0	4,5E-08	-3,1	0,018	-3,3
hsa-miR-204-5p	0,013	-2,1	0,00075	-2,9	0,047	-2,3
hsa-let-7g-5p	6,1E-06	-2,2	0,0037	-1,1	0,002	-3,7
hsa-miR-509-3-5p	0,0065	-2,5	0,006	-2,6	0,011	-2,9
hsa-miR-100-5p	5,6E-07	-2,7	1,5E-05	-1,9	0,0037	-3,8
hsa-miR-424-5p	6E-07	-2,8	1,5E-11	-4,4	0,048	-4,8
hsa-let-7c-5p	1,5E-05	-3,4	4,4E-09	-3,6	0,000039	-5,3
hsa-miR-125b-5p	2,8E-06	-3,5	2,3E-06	-2,7	0,0051	-5,9
hsa-miR-99a-5p	6,7E-08	-3,7	9,9E-09	-3,9	0,000039	-5,3
hsa-miR-508-3p	0,00051	-4,8	0,00038	-5,1	0,024	-4,4

Abreviações: miRNAs, microRNAs.

5.7 Análise dos microRNAs diferencialmente expressos específico para cada tipo histológico dos TCGs

Para caracterizar a expressão de miRNAs específicos para cada tipo histológico dos TCGs, foi realizada uma análise par a par comparando as diferentes histologias com as amostras controle-normal. Nessas análises foram considerados todas as amostras de ovário e testículo contendo todos os tipos histológicos malignos. Para isto, foi realizado o teste T de *Welch* que é uma adaptação do teste t de *Student* e mais confiável quando as duas amostras têm variâncias desiguais e tamanhos de amostra desiguais.

- **miRNAs específicos de seio endodérmico**

Na comparação entre as amostras de seio endodérmico e tecido normal observou-se um dendograma com dois agrupamentos distintos, separando claramente as amostras normais das tumorais. Ainda, dentro do agrupamento de amostras-controle observam-se dois subgrupos separando as localizações, ovário e testículo, pela expressão de determinados miRNAs (**Figura 26**).

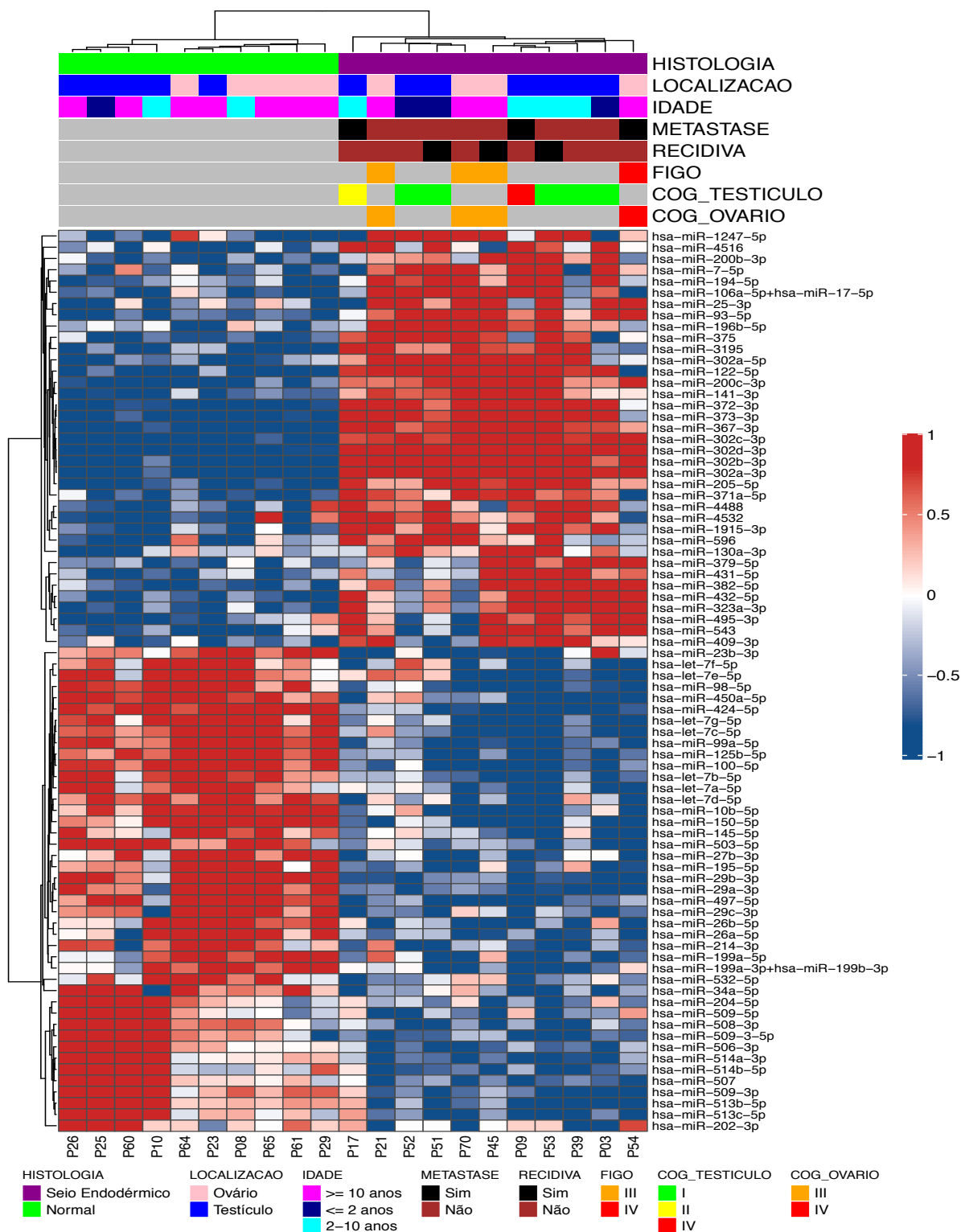


Figura 26 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de tumor de seio endodérmico e amostras-controle. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*.

Neste *heat map* observou-se um total de 80 miRNAs diferencialmente expressos. Trinta e sete miRNAs foram diferencialmente expressos em tumores de seio endodérmico e 43 miRNAs em amostras-controle. Considerando as análises do diagrama de Venn (**Figura 25**), 25 miRNAs foram exclusivamente expressos nos tumores de seio endodérmico (**Tabela 16**), sendo os mais expressos os hsa-miR-122-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-302a-5p e menos expressos os hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-202-3p e hsa-miR-532-5p.

Tabela 16 – Lista dos 25 miRNAs diferencialmente expressos exclusivamente em tumores de seio endodérmico, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

miRNAs	p_adj	Log2 Fold Change
hsa-miR-122-5p	0,000019	9,6
hsa-miR-200c-3p	0,000000084	3,6
hsa-miR-302a-5p	0,00025	2,4
hsa-miR-323a-3p	0,00025	2,3
hsa-miR-141-3p	0,000014	2,2
hsa-miR-196b-5p	0,0049	1,9
hsa-miR-375	0,0017	1,8
hsa-miR-432-5p	0,00053	1,8
hsa-miR-3195	0,00039	1,6
hsa-miR-4488	0,0027	1,5
hsa-miR-1247-5p	0,031	1,4
hsa-miR-431-5p	0,0041	1,4
hsa-miR-4516	0,0041	1,4
hsa-miR-382-5p	0,00092	1,3
hsa-miR-4532	0,0035	1,3
hsa-miR-543	0,0081	1,3
hsa-miR-106a-5p+hsa-miR-17-5p	0,002	1,1
hsa-miR-409-3p	0,02	1,1
hsa-miR-495-3p	0,008	1,1
hsa-miR-379-5p	0,0074	1,0
hsa-miR-26b-5p	0,00046	-1,0
hsa-miR-34a-5p	0,0032	-1,0
hsa-miR-532-5p	0,02	-1,1
hsa-miR-202-3p	0,049	-1,4
hsa-miR-29b-3p	0,0000012	-2,9

Abreviações: miRNAs, microRNAs.

- **miRNAs específicos de disgerminoma**

Na comparação entre as amostras de disgerminoma e tecido normal também se observou um dendograma com dois agrupamentos distintos, separando claramente as amostras normais das tumorais (**Figura 27**).

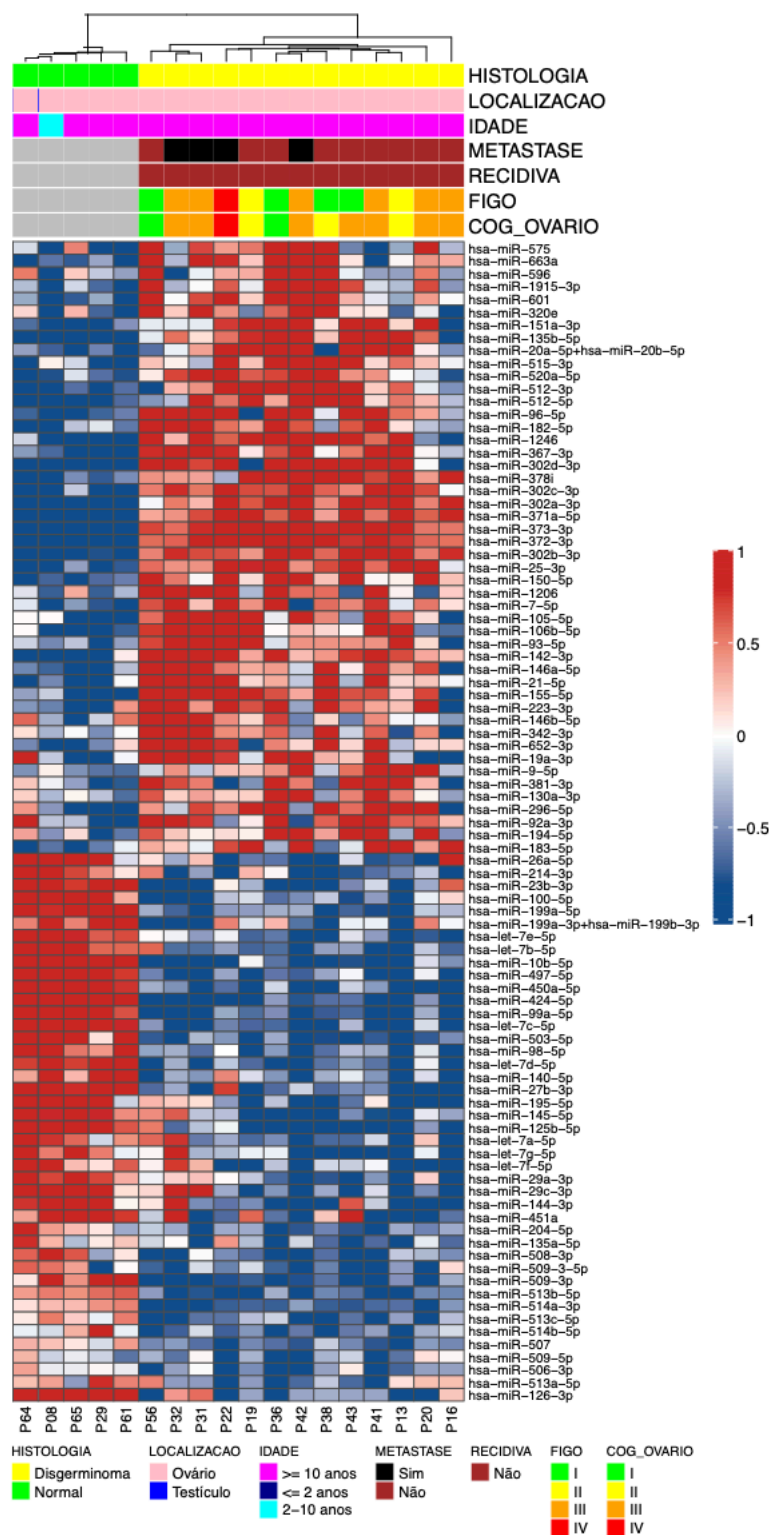


Figura 27 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de disgerminoma e amostras-controle. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do cluster é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*.

No *heat map* observa-se um total de 91 miRNAs diferencialmente expressos, sendo 48 miRNAs superexpressos em disgerminoma e 43 miRNAs superexpressos em amostras-controle. Entretanto, miRNAs exclusivos tumores de disgerminoma e diferencialmente expressos, encontramos 34 segundo diagrama de Venn (**Figura 25**) (**Tabela 17**).

Considerando as análises do diagrama de Venn (**Figura 25**), 34 miRNAs foram exclusivamente expressos nos disgerminomas (**Tabela 17**), sendo os mais expressos os hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-21-5p e menos expressos os hsa-miR-451a, hsa-miR-144-3p e hsa-miR-513a-5p.

Tabela 17 – Lista dos 34 miRNAs diferencialmente expressos exclusivamente em disgerminomas, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

miRNAs	p_adj	Log2 Fold Change
hsa-miR-142-3p	0,00000013	3,8
hsa-miR-146a-5p	0,00026	2,8
hsa-miR-21-5p	0,0001	2,7
hsa-miR-182-5p	0,00068	2,4
hsa-miR-223-3p	0,00067	2,1
hsa-miR-601	0,00018	2,1
hsa-miR-135b-5p	0,0045	2,1
hsa-miR-9-5p	0,0013	2
hsa-miR-512-3p	0,00048	1,9
hsa-miR-663a	0,00037	1,9
hsa-miR-105-5p	0,00037	1,8
hsa-miR-155-5p	0,000022	1,7
hsa-miR-296-5p	0,0052	1,6
hsa-miR-515-3p	0,00041	1,5
hsa-miR-512-5p	0,00036	1,4
hsa-miR-96-5p	0,000095	1,4
hsa-miR-378i	0,0000012	1,3
hsa-miR-520a-5p	0,000000045	1,3
hsa-miR-106b-5p	0,00026	1,2
hsa-miR-151a-3p	0,0013	1,2
hsa-miR-92a-3p	0,022	1,1
hsa-miR-1206	0,013	1
hsa-miR-146b-5p	0,047	1
hsa-miR-183-5p	0,0042	1
hsa-miR-19a-3p	0,032	1
hsa-miR-20a-5p+hsa-miR-20b-5p	0,0045	1
hsa-miR-320e	0,047	1
hsa-miR-381-3p	0,026	1
hsa-miR-575	0,012	1
hsa-miR-652-3p	0,0079	1
hsa-miR-126-3p	0,047	-1
hsa-miR-513a-5p	0,0045	-1,4
hsa-miR-144-3p	0,0046	-1,5
hsa-miR-451a	0,033	-1,8

Abreviações: miRNAs, microRNAs.

- **miRNAs específicos de carcinoma embrionário**

Na comparação entre as amostras de carcinoma embrionário e tecido normal também se observou um dendograma com dois agrupamentos distintos, separando claramente as amostras normais das tumorais (**Figura 28**).

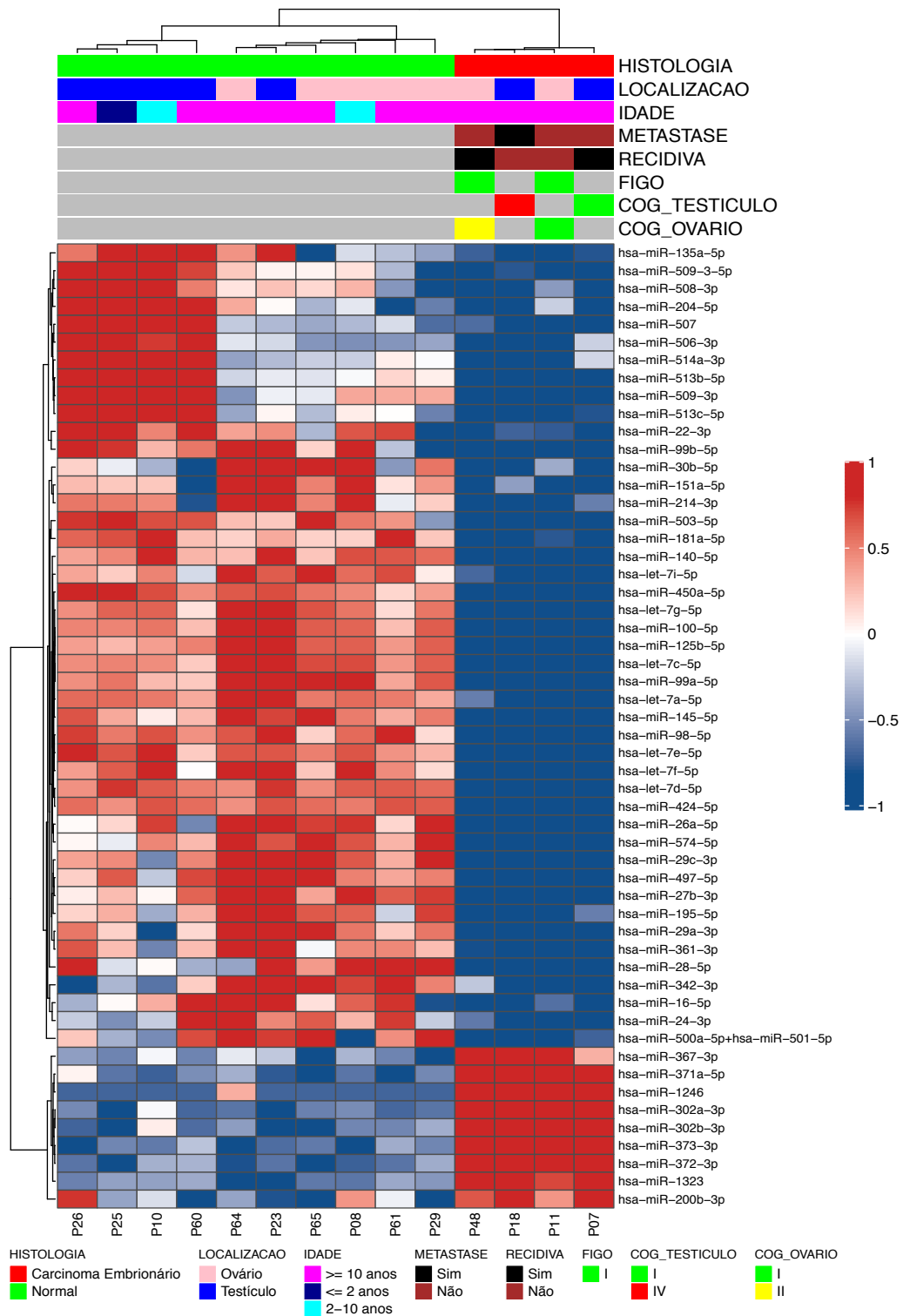


Figura 28 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de carcinoma embrionário e amostras-controle. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do *cluster* é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*.

Analisando o *heat map* foi observado um total de 54 miRNAs diferencialmente expressos, sendo nove miRNAs superexpressos e 45 miRNAs menos expressos em carcinoma embrionário. Considerando as análises do diagrama de Venn (**Figura 25**), 13 miRNAs foram exclusivamente expressos nos carcinomas embrionários (**Tabela 18**), sendo somente o hsa-miR-1323 superexpresso.

Tabela 18 – Lista dos 13 miRNAs diferencialmente expressos exclusivamente em carcinoma embrionário, de acordo com Diagrama de Venn. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

miRNAs - Venn 4 grupos	p_adj	Log2 Fold Change
hsa-miR-1323	0,025	3,8
hsa-miR-28-5p	0,00027	-1,1
hsa-miR-24-3p	0,011	-1,2
hsa-miR-361-3p	0,0035	-1,2
hsa-miR-500a-5p+hsa-miR-501-5p	0,006	-1,2
hsa-miR-16-5p	0,006	-1,3
hsa-miR-574-5p	0,0042	-1,3
hsa-miR-30b-5p	0,021	-1,5
hsa-miR-151a-5p	0,022	-1,6
hsa-miR-99b-5p	0,0033	-1,6
hsa-miR-22-3p	0,018	-2
hsa-miR-181a-5p	0,04	-2,4
hsa-let-7i-5p	0,029	-3

Abreviações: miRNAs, microRNAs.

- **miRNAs específicos de teratoma imaturo**

Na comparação entre as amostras de teratoma imaturo e tecido normal, novamente foi observado um dendograma com dois agrupamentos distintos, separando claramente as amostras normais das tumorais (**Figura 29**).

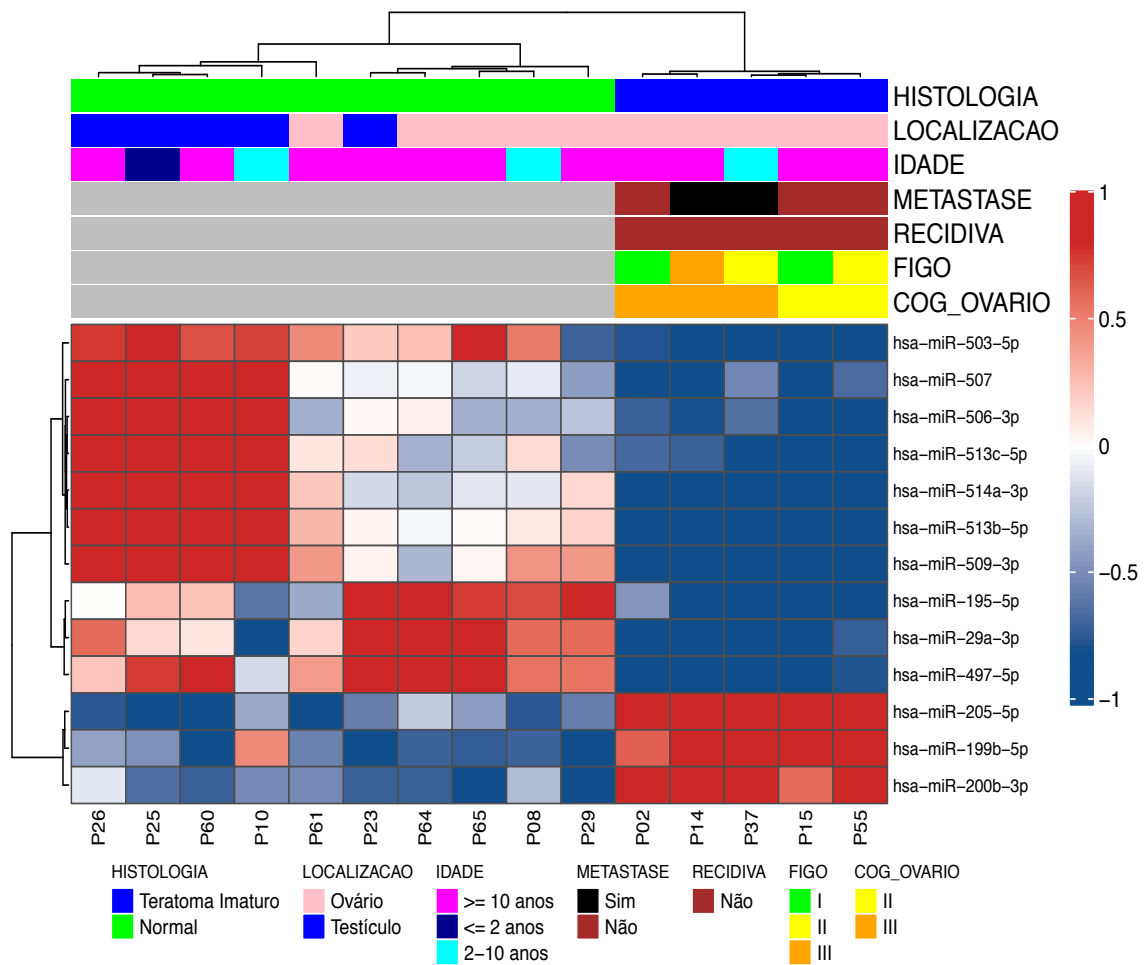


Figura 29 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de teratoma imaturo e amostras-controle. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do *cluster* é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*.

O *heat map* mostra 13 miRNAs diferencialmente expressos, nos quais somente 3 miRNAs foram diferencialmente expressos em teratoma imaturo e 10 miRNAs em amostras-controle. Analisando o diagrama de Venn **Figura 25** observa-se que apenas um miRNA foi exclusivo de teratoma imaturo, o hsa-miR-199b-5p (p_{adj} 0,0013 e log_2 fold change de 3,1).

- **miRNAs específicos de teratoma maduro**

Na comparação entre as amostras de teratoma maduro e tecido normal, foi observado um dendograma com dois agrupamentos distintos (**Figura 30**). Esta análise revelou 21 miRNAs diferencialmente expressos nas amostras, sendo 10 miRNAs superexpressos em teratoma maduro e 11 miRNAs em amostras-controle.

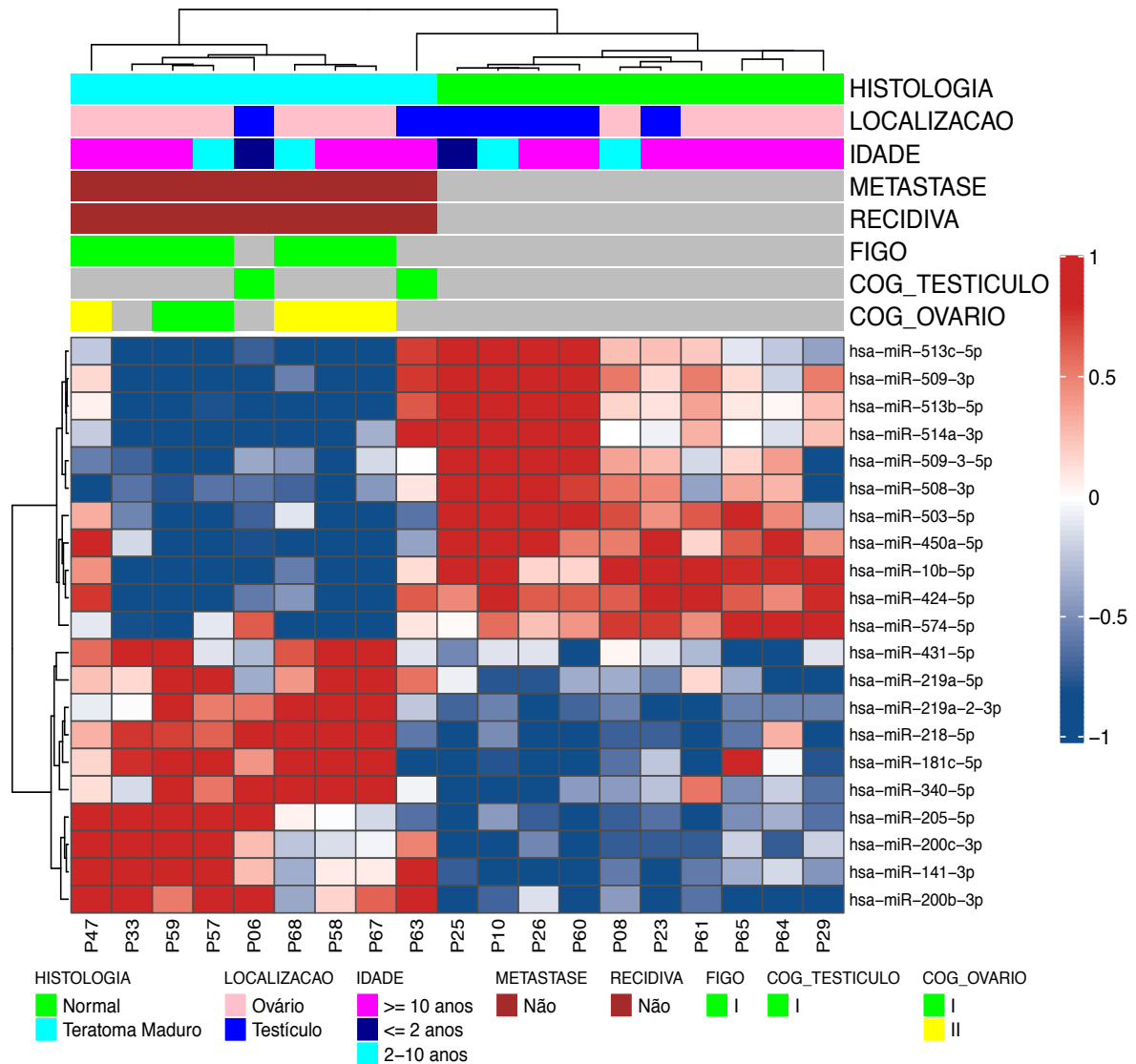


Figura 30 - Análise dos miRNAs diferencialmente expressos entre as amostras de teratoma maduro e amostras-controle. Os miRNAs foram agrupados de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelos pacientes e as linhas pelos miRNAs. A coloração do *cluster* é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave na lateral do *cluster*.

Portanto, conforme descrito anteriormente, cada tipo histológico de TCGs apresentou uma assinatura de miRNAs diferencialmente expresso, sugerindo a utilização dos mesmos como biomarcadores específicos para o diagnóstico e prognóstico dos pacientes. A **Figura 31** descreve os cinco miRNAs mais superexpressos e significativos em cada histologia.

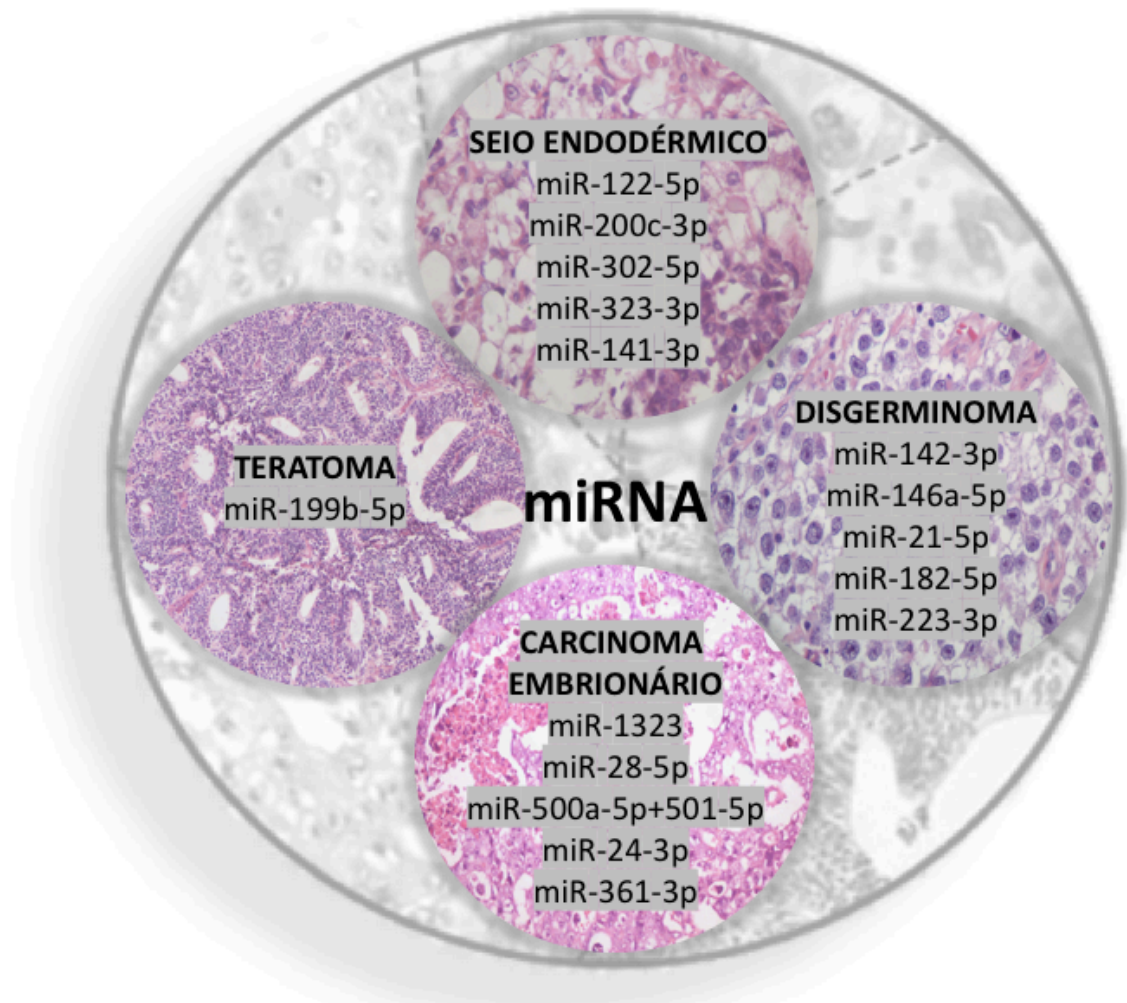


Figura 31 – miRNAs mais diferencialmente expressos e específicos para cada tipo histológico, dados do estudo.

5.8 Relação da expressão dos microRNAs com as características clínicas

De acordo com as análises do diagrama de Venn (**Figura 25**), 26 miRNAs foram comuns entre os tipos histológicos disgerminoma, seio endodérmico e carcinoma embrionário (**Tabela 19**), sendo somente seis miRNAs superexpressos (hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-371a-5p, hsa-miR-372-3p, e hsa-miR-373-3p), os quais foram selecionados e relacionados com as características clínicas dos pacientes deste estudo (**Tabela 20 A e Tabela 20 B**).

Tabela 19 – Relação dos 26 miRNAs que foram diferencialmente expressos em comum entre os tipos histológicos disgerminoma, seio endodérmico e carcinoma embrionário. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

miRNAs - Venn 4 grupos	p_adj	Log2 Fold Change
hsa-miR-302b-3p	0,000000000052	9,3
hsa-miR-302a-3p	0,00000000016	7,5
hsa-miR-372-3p	0,00000002	6,5
hsa-miR-373-3p	0,00000026	6
hsa-miR-367-3p	0,00000000016	5,8
hsa-miR-371a-5p	0,0014	1,8
hsa-miR-27b-3p	0,00034	-1
hsa-let-7e-5p	0,0046	-1
hsa-miR-214-3p	0,011	-1,1
hsa-let-7d-5p	0,00059	-1,3
hsa-let-7f-5p	0,0021	-1,3
hsa-miR-98-5p	0,0000033	-1,4
hsa-miR-26a-5p	0,0023	-1,5
hsa-miR-29c-3p	0,0013	-1,7
hsa-miR-145-5p	0,0021	-1,9
hsa-let-7a-5p	0,00048	-2
hsa-miR-450a-5p	0,000089	-2
hsa-miR-204-5p	0,013	-2,1
hsa-let-7g-5p	0,0000061	-2,2
hsa-miR-509-3-5p	0,0065	-2,5
hsa-miR-100-5p	0,00000056	-2,7
hsa-miR-424-5p	0,0000006	-2,8
hsa-let-7c-5p	0,000015	-3,4
hsa-miR-125b-5p	0,0000028	-3,5
hsa-miR-99a-5p	0,000000067	-3,7
hsa-miR-508-3p	0,00051	-4,8

Abreviações: miRNAs, microRNAs.

Tabela 20 A – Relação das características clínicas dos pacientes TCGs com os miRNAs diferencialmente expressos em comum nos tumores de seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

Características		hsa-miR-302a-3p		hsa-miR-302b-3p		hsa-miR-367-3p	
		Mediana (min;máx)	p valor	Mediana (min;máx)	p valor	Mediana (min;máx)	p valor
Histologia	Seio endodérmico	11,8 (11,1 ; 11,8)		13,3 (11,5 ; 13,8)		8,5 (6,7 ; 9,5)	
	Carcinoma embrionário	10,3 (8,5 ; 11,2)		11,6 (9,6 ; 13,1)		7,3 (4,2 ; 8,5)	
	Teratoma maduro	3,7 (2,3 ; 4,6)	< 0,001*	3,6 (3,0 ; 4,5)	< 0,001*	-	< 0,001*
	Teratoma imaturo	5,1 (4,3 ; 9,9)		5,0 (3,0 ; 11,6)		3,4 (2,5 ; 5,0)	
	Disgerminoma/seminoma	7,9 (6,2 ; 10,3)		9,9 (8,7 ; 11,7)		5,1 (3,4 ; 6,9)	
Risco	Baixo risco	4,6 (2,3 ; 11,8)		5,0 (3,0 ; 13,7)		6,1 (2,5 ; 8,9)	
	Risco intermédio	9,3 (6,2 ; 11,5)	0,050*	11,5 (8,2 ; 13,3)	0,041*	5,4 (3,8 ; 9,3)	0,854*
	Alto risco	8,6 (5,1 ; 11,8)		10,9 (4,3 ; 13,7)		5,8 (3,4 ; 9,5)	
Metástase	Sim	10,1 (5,1 ; 11,8)	0,128**	11,2 (4,4 ; 13,3)	< 0,001**	6,3 (3,4 ; 9,5)	0,603**
	Não	7,8 (2,3 ; 11,8)		9,5 (3,0 ; 13,8)		5,7 (2,5 ; 9,4)	
AFP	Normal	6,8 (2,3 ; 11,8)	0,001**	8,8 (3,0 ; 12,6)	< 0,001**	5,1 (3,1 ; 7,9)	0,002**
pré cirurgia	Aumentada	11,6 (6,9 ; 11,8)		13,3 (9,6 ; 13,7)		8,2 (5,6 ; 9,5)	
Recidiva	Não	7,7 (2,3 ; 11,8)	0,016**	9,6 (3,0 ; 13,7)	0,029**	5,6 (2,5 ; 9,5)	0,116**
	Sim	11,5 (8,5 ; 11,8)		12,6 (9,6 ; 13,7)		7,9 (4,2 ; 9,4)	
Status	Vivo	7,9 (2,3 ; 11,8)	0,009**	9,6 (3,0 ; 13,7)	0,036**	5,6 (2,5 ; 9,5)	0,115**
	Óbito	11,8 (11,5 ; 11,8)		12,6 (12,6 ; 13,7)		7,9 (6,7 ; 9,4)	

Abreviações: TCGs, Tumores de células germinativas; miRNAs, microRNAs; AFP, Alfafetoproteína, Min, mínimo; Máx, máximo. * Teste de Kruskal-Wallis; ** Teste de Man-Whitney.

Tabela 20 B – Relação das características clínicas dos pacientes TCGs com os miRNAs diferencialmente expressos em comum nos tumores de seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário. (Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos - Hospital de Câncer de Barretos).

Características		hsa-miR-371a-5p		hsa-miR-372-3p		hsa-miR-373-3p	
		Mediana (min;máx)	p valor	Mediana (min;máx)	p valor	Mediana (min;máx)	p valor
Histologia	Seio endodérmico	5,8 (3,3 ; 7,3)		10,1 (6,5 ; 11,1)		9,5 (5,1 ; 10,5)	
	Carcinoma embrionário	7,1 (6,6 ; 7,8)		9,6 (8,7 ; 10,3)		9,3 (8,8 ; 9,6)	
	Teratoma maduro	3,5 (2,0 ; 4,7)	< 0,001*		0,061*		< 0,001*
	Teratoma imaturo					2,5 (0 ; 4,6)	
	Disgerminoma/seminoma	7,2 (6,5 ; 8,3)		10,9 (9,5 ; 11,6)		10,9 (9,4 ; 11,6)	
Risco	Baixo risco	5,1 (2,0 ; 7,8)		10,1 (8,5 ; 11,6)		9,5 (0 ; 11,4)	
	Risco intermédio	7,6 (5,9 ; 7,9)	< 0,001*	10,1 (9,7 ; 11,4)	0,642*	9,5 (3,1 ; 11,2)	0,732*
	Alto risco	7,0 (3,3 ; 8,3)		10,5 (6,5 ; 11,6)		9,9 (2,5 ; 11,6)	
Metástase	Sim	7,1 (3,3 ; 8,3)	0,073**	10,3 (6,5 ; 11,6)	0,784**	9,5 (2,5 ; 11,6)	0,802**
	Não	5,9 (2,0 ; 8,2)		10,2 (8,5 ; 11,6)		9,5 (0 ; 11,4)	
AFP	Normal	6,5 (2,0 ; 8,3)	0,711**	10,8 (6,5 ; 11,6)	0,573**	10,9 (2,5 ; 11,6)	0,351**
pré cirurgia	Aumentada	5,9 (5,5 ; 7,3)		10,2 (9,5 ; 11,1)		9,5 (9,4 ; 10,5)	
Recidiva	Não	6,6 (2,0 ; 8,3)	>0,999**	10,3 (6,5 ; 11,6)	0,413**	9,5 (0 ; 11,6)	0,942**
	Sim	5,9 (5,1 ; 7,8)		10,1 (8,5 ; 11,1)		9,5 (8,5 ; 10,5)	
Status	Vivo	6,7 (2,0 ; 8,3)	0,202**	10,3 (8,7 ; 11,6)	0,219**	9,5 (0 ; 11,6)	0,491**
	Óbito	5,1 (3,3 ; 5,9)		8,5 (6,5 ; 11,1)		8,5 (5,1 ; 10,5)	

Abreviações: TCGs, Tumores de células germinativas; miRNAs, microRNAs; AFP, Alfafetoproteína, Min, mínimo; Máx, máximo. *Teste de Kruskal-Wallis; **Teste de Man Whitney.

As análises revelaram uma associação entre a histologia dos tumores com a expressão dos miRNAs, com exceção do hsa-miR-372-3p. Para identificar qual histologia estaria mais associada à expressão de cada miRNA, foi realizado um gráfico *box plot* independente-simples Kruskal-Walis, seguido do teste de *Bonferroni* (**Figura 32**). Os tumores de seio endodérmico expressaram mais hsa-miR-302a-3p, hsa-miR302b-3p e hsa-miR-367-3p comparados com as demais histologias, seguido do carcinoma embrionário. Ao passo que os disgerminomas expressaram mais os hsa-miR-371a-5p e hsa-miR-373-3p. Entretanto, a expressão de hsa-miR-372-3p não se difere entre as histologias.

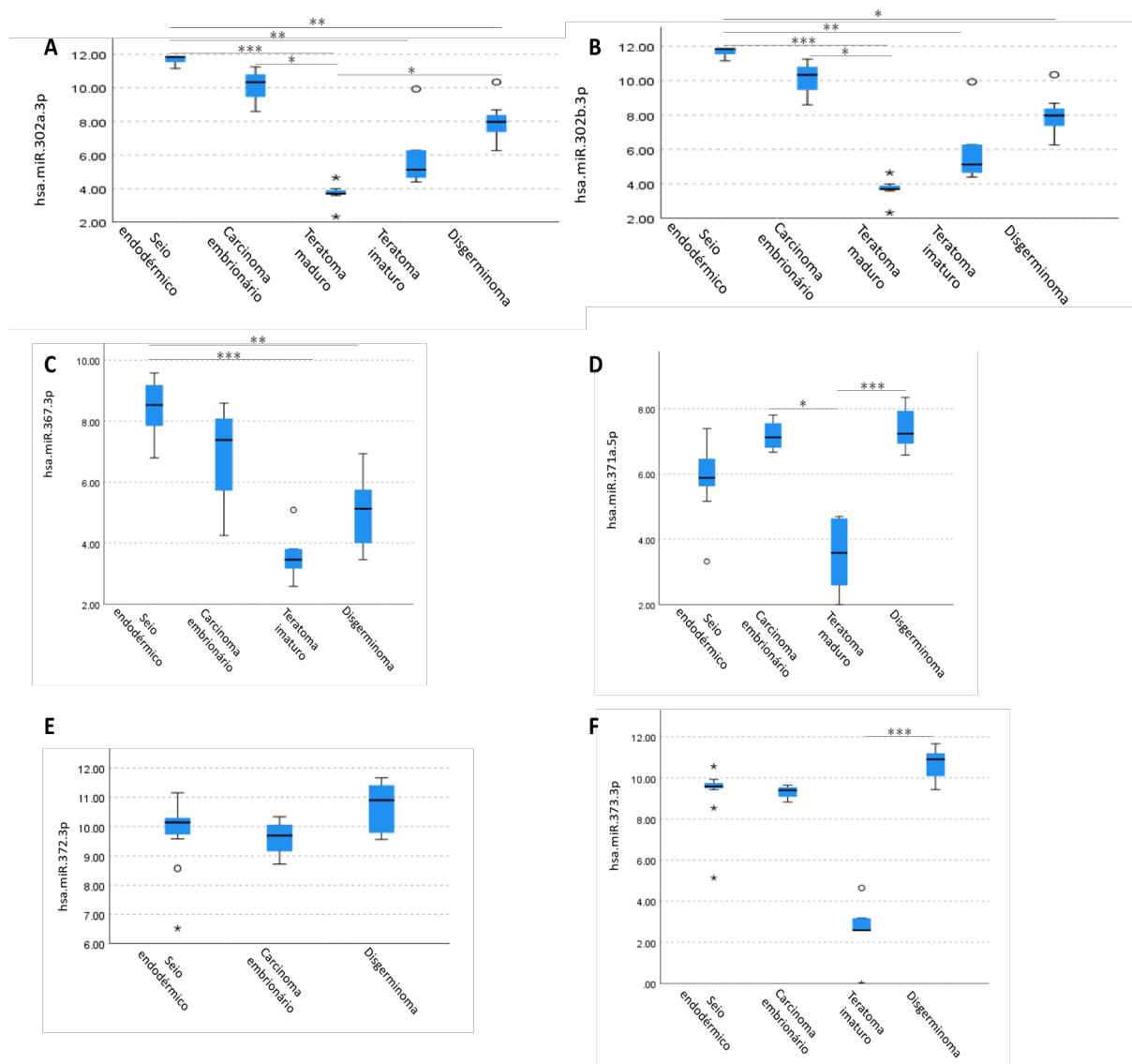


Figura 32 – Comparação da expressão dos miRNAs hsa-miR-302a-3p (A), hsa-miR-302b-3p (B), hsa-miR-367-3p (C), hsa-miR-371a-5p (D), hsa-miR-372-3p (E), e hsa-miR-373-3p (F) nos diferentes tipos histológicos. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

A expressão dos seis miRNAs foi associada ao risco, metástase, marcador AFP pré-cirurgia, recidiva e status. O hsa-miR-302b-3p foi o único que apresentou associação significativa com todos esses parâmetros, seguido do hsa-miR-302a-3p que também apresentou associação, com exceção da metástase (**Tabela 20 A**). O tamanho amostral impossibilita análise de sobrevida, entretanto, pacientes que foram a óbito tiveram maior expressão desses miRNAs (hsa-miR-302a-3p e hsa-miR-302b-3p). O hsa-miR-367-3p apresentou associação somente com o marcador AFP pré-cirurgia (**Tabela 20 A**) e o hsa-miR-371a-5p teve associação com o risco (**Tabela 20 B**). Os demais miRNAs não apresentaram associação significativa com os parâmetros avaliados.

6 DISCUSSÃO

Os tumores de células germinativas (TCGs) compõem um grupo raro e heterogêneo de tumores que se originam de células germinativas primordiais e apresentam padrões histológicos distintos. Podem acometer sítios gonadais, como testículo e ovário ou extragonadais, incluindo as regiões sacrococcígea, mediastinal, cerebral, cervical e retroperitoneal^{12,18}. O diagnóstico é estabelecido com base em dados clínicos, histopatológicos e laboratoriais, incluindo a dosagem dos marcadores biológicos AFP, BHCG e DHL¹⁸. Estes marcadores são importantes indicativos de malignidade, quando em altos títulos, e úteis para avaliação do curso da doença e prognóstico. Podem ser analisados por meio de amostras de sangue, líquido cerebrospinal e secreções⁹⁴. Entretanto, embora esses marcadores sejam utilizados no diagnóstico e prognóstico dos pacientes pediátricos com TCGs, eles não são específicos para esse tipo tumoral. Dessa forma, o presente estudo teve como finalidade identificar microRNAs diferencialmente expressos que possam ser úteis no diagnóstico, acompanhamento e prognóstico dos pacientes pediátricos com tumores de células germinativas de ovário e testículo.

Foram avaliados 42 pacientes com TCG pediátrico, incluindo 31 TCGs de ovário e 11 TCGs de testículo. Dentre os tumores de ovário, a média de idade foi de 14 anos, a maioria de baixo risco e histologia mais frequente disgerminoma, seguido de teratomas. Por outro lado, dentre os tumores de testículo, a média de idade foi 5 anos, a maioria também de baixo risco e tumor de seio endodérmico foi o grupo histológico mais frequente, também seguido de teratomas. Esses dados corroboram com a distribuição etária no TCG pediátrico que é bimodal, apresentando um pico em menores de 5 anos e novamente na adolescência^{28, 29}. Ademais, os tipos histológicos tumor de seio endodérmico e teratomas, ou uma mistura destes dois (tumor misto) são os mais frequentes em crianças menores e os seminomas/disgerminomas em pacientes na puberdade e adulto jovem¹⁴. Entretanto, os casos mistos não foram analisados para que um componente não interferisse nos resultados ou no agrupamento dos casos.

Aproximadamente 24% dos pacientes apresentaram metástase. Em relação às recidivas, 6,5% dos pacientes com TCG de ovário e 27,3% dos pacientes com TCGs testiculares recidivaram. Esses dados condizem com as diretrizes da Associação Europeia de Urologia (EAU) para câncer de testículo, no qual 15 a 30% dos pacientes com TCGTs terão recaída após

quimioterapia de primeira linha e necessitarão de terapias adicionais. Vale ressaltar aqui que a amostra deste estudo foi aleatória e por conveniência e não reflete a inclusão de todos os casos e sua distribuição e evolução pode não representar todos os aspectos descritos na literatura, uma vez que alguns casos não foram incluídos no estudo. O número de óbitos por câncer na nossa casuística foi baixo (7,2%) condizente com a alta sobrevida da doença, acima de 90%⁹⁵.

Em relação à expressão dos marcadores biológicos AFP, BHCG e DHL a maioria dos pacientes, quando quantificados, apresentou dosagem normal, demonstrando a falta de especificidade desses marcadores para TCG e a importância de se buscar novos biomarcadores, como os miRNAs.

Os miRNAs podem regular centenas de alvos genéticos controlando o crescimento celular, diferenciação e apoptose⁶⁹. Esses mecanismos são considerados fundamentais para que uma célula torne-se maligna, que incluem as seguintes características: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais inibitórios do crescimento, evasão a apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão tecidual seguido de metástase⁹⁶. Os miRNAs também têm papel na tumorigênese podendo funcionar como supressores de tumor (regular negativamente oncogenes) e oncomiRs (inibir a expressão dos genes supressores tumorais). A avaliação do perfil de expressão de miRNAs em câncer permite descobertas sobre caminhos que levam a tumorigênese, devido ao fato de os tumores apresentarem assinaturas específicas de miRNAs, permitindo o entendimento dos mecanismos moleculares que regem este processo e, conseqüentemente, conduzem à informação que podem prever o prognóstico da doença⁹⁷.

Na tentativa de estabelecer novos marcadores para TCG pediátrico, a expressão dos miRNAs foi avaliada em pacientes pediátricos com TCG de ovário e testículo, utilizando uma tecnologia avançada com sistema automatizado extremamente sensível que dispensa validação por qualquer outro método e capaz de detectar fragmentos pequenos provenientes de amostras com alto grau de degradação⁹⁰, o *nCounter*[®] (NanoString Technologies).

Inicialmente, foi realizada uma análise comparando amostras normais com tumorais de ovário e outra análise comparando amostras normais com tumorais de testículo. Em ambas as análises foi observado um dendrograma com dois agrupamentos distintos, separando as amostras de tecido normal, teratoma maduro e imaturo das amostras de tecido tumoral com componente histológico maligno. Essa mesma separação foi observada nas análises t-SNE,

cujas amostras tumorais de disgerminoma, carcinoma embrionário e seio endodérmico mostraram maior separação das amostras normais quando comparadas aos teratomas maduros e imaturos. Portanto, embora diversos fatores possam influenciar a separação das amostras pela expressão de miRNAs, fica claro que, independente do local do tumor, idade do paciente e suas características clínicas, o tipo histológico celular é o fator mais importante e responsável pela clusterização das amostras.

Na comparação entre amostras normais com tumorais de ovário identificaram-se 49 miRNAs diferencialmente expressos e entre as amostras normais com tumorais de testículo identificaram-se 51 miRNAs. As duas comparações revelaram os mesmos miRNAs mais diferencialmente expressos, que incluíram os agrupamentos hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-1246, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-205-5p e hsa-miR-200c-3p.

O hsa-miR-205-5p está localizado na região cromossômica 1q32.2 do genoma humano e pode estar envolvido na progressão e quimiorresistência de vários tipos de câncer⁹⁸ atuando como um oncogene ou supressor de tumor. Tem associação com migração de células estromais na endometriose⁹⁹, íntima associação com a ocorrência e desenvolvimento do câncer de mama, resistência a gemcitabina no tratamento da doença¹⁰⁰ e contribui para a resistência ao paclitaxel no câncer endometrial⁹⁸. Ainda, está relacionado com carcinoma da nasofaringe, câncer colorretal, na angiogênese e é capaz de regular vias de sinalização celular associadas como a migração celular, proliferação e apoptose¹⁰¹.

O hsa-miR-1246, superexpresso nas amostras de ovário, está localizado na região cromossômica 2q31.1, sendo considerado um oncomiR em vários tipos de câncer¹⁰² como câncer de pulmão, pâncreas e colorretal. Está associado ao aumento da capacidade de migração e invasão celular¹⁰³, bem como com a promoção da angiogênese tumoral e de metástases¹⁰².

O hsa-miR-200c-3p associado a outros miRNAs pode controlar o desenvolvimento e a autorrenovação das células germinativas masculinas¹⁰⁴. Além disso, mostrou-se relacionado a outros tipos de câncer como nefroblastoma reduzindo comportamentos malignos (proliferação celular, migração e invasão)¹⁰⁵; câncer de pulmão associados à resistência ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e inibidores de tirosina quinase¹⁰⁶; e colorretal¹⁰⁷, propondo-se os microRNAs hsa-miR-200c-3p e hsa-miR-141-3p como potenciais biomarcadores.

Analisando a expressão dos miRNAs em comum entre os tumores malignos, tumor de seio endodérmico, disgerminoma e carcinoma embrionário e comparando-os às amostras-controle de testículo e ovário, foi observado um total de 26 microRNAs. Destes, somente seis estavam superexpressos incluindo os hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-371a-5p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p e hsa-miR-367-3p. Esses achados corroboram com os descritos na literatura que destacam esses mesmos miRNAs com relevância na clínica^{82, 83}, sendo que os estudos mais recentes foram realizados em tumores de células germinativas testiculares⁸¹.

Após a identificação desses seis miRNAs, propusemos identificar qual histologia estaria mais associada à expressão de cada um deles. Os tumores de seio endodérmico expressaram mais hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302b-3p e hsa-miR-367-3p comparados com as demais histologias, seguidos do carcinoma embrionário. Por outro lado, os disgerminomas expressaram mais hsa-miR-371a-5p e hsa-miR-373-3p. Entretanto, os hsa-miR-302a-3p e hsa-miR-302b-3p foram os miRNAs que apresentaram associação significativa com estratificação de risco, marcador AFP aumentado pré-cirurgia, presença de recidiva ao diagnóstico e status, e este último ainda mostrou associação com presença de metástase ao diagnóstico. O tamanho amostral impossibilitou a análise de sobrevida, sendo uma limitação deste estudo. Entretanto, pacientes que foram a óbito tiveram maior expressão do hsa-miR-302a-3p e hsa-miR-302b-3p.

Murray e colaboradores⁸⁶ evidenciaram o potencial de miR-371 ~ 373 e miR-302/367 como biomarcadores séricos de TCGs malignos na pediatria⁸⁶. O uso do miR-371a-3p circulante foi analisado como um marcador para o manejo do tumor maligno de células germinativas em pacientes com TCGT antes da orquiectomia comparando com os marcadores séricos AFP, BHCG e DHL. O teste miR-371a-3p mostrou uma especificidade de 100%, sensibilidade de 93% e AUC de 0,978 de TCG viável pré-orquiectomia, destacando a utilidade deste miRNA quando positivo em ambientes pós-quimioterapia e ainda quando em contexto de testículo único, a fim de decidir procedimentos cirúrgicos de doença residual extratesticular⁸⁷.

Nos últimos anos, os miRNAs mostraram superar os marcadores tumorais séricos clássicos no diagnóstico de TCGs primários e no monitoramento de acompanhamento, sendo de fundamental importância sua detecção precoce em situações de recidiva, em especial, o hsa-miR-371a-3p¹⁰⁸. Trinta e oito de 46 pacientes com doença recorrente tiveram níveis

elevados deste miRNA, produzindo uma sensibilidade de 83% e especificidade de 96% na detecção de recidiva⁸⁵. Em TCGs testiculares foi possível encontrar um diferencial na expressão dos miRNAs, especialmente entre subtipos como teratoma (baixa ou nenhuma expressão), seminoma (expressão média) e carcinoma embrionário (expressão muito alta)¹⁰⁸. Nossas análises mostraram que os seis miRNAs foram associados à histologia e carcinomas embrionários e disgerminomas expressaram significativamente mais o hsa-miR-371a-5p que os teratomas maduros. Esses dados corroboram com a ideia de Dieckmann e colaboradores¹⁰⁹ que afirmaram que o hsa-miR.-371a-3p é o marcador mais consistente com melhor desempenho diagnóstico que os marcadores clássicos (não para teratoma). Além disso, exibe mais de 90% de sensibilidade e especificidade diagnóstica em TCG e ainda está correlacionado com carga de doença e resposta^{85, 110}.

A expressão do hsa-miR-372-3p também é associada a outros tipos de câncer, tais como câncer gástrico¹¹¹, câncer hepático¹¹² e colorretal¹¹³. Está significativamente aumentado no diagnóstico de TCG⁷⁸ e são oncogenes responsáveis pelo crescimento tumorigênico no desenvolvimento de tumores de células germinativas testiculares⁸¹.

Para cada grupo histológico encontramos miRNAs específicos como mostrado na Figura 31. O miR-199b-5p foi superexpresso e específico nos teratomas. Hsieh e colaboradores¹¹⁴ estudaram pacientes com TCG em SNC e mostraram uma regulação positiva em não germinomas¹¹⁴. Ainda, este microRNA também foi descrito em pacientes portadores de meduloblastoma, apresentando expressão significativamente reduzida em casos metastáticos¹¹⁵. Garzia e colaboradores¹¹⁶ mostraram que a expressão do miR-199b-5p se correlaciona com a metástase, identificando um novo marcador molecular para uma classe de baixo risco em pacientes com meduloblastoma. Ainda, os pesquisadores observaram em um modelo de xenoinxerto que a carga de tumor meduloblastoma pode ser reduzida, indicando o uso de miR199b-5p como uma terapia adjuvante após a cirurgia, em combinação com radiação e quimioterapia para a melhoria das terapias meduloblastoma anticâncer e qualidade de vida do paciente¹¹⁶. Nanopartículas lipídicas com a associação deste microRNA ao miR-204-5p *in vitro* foram testadas e atuam como potencializadores de terapia alvo em melanoma metastático, sendo altamente eficientes em impedir a proliferação e a viabilidade das células de melanoma, discriminando uma necessidade de avaliação em modelos de tumor *in vivo*¹¹⁷.

Dentre as amostras de carcinoma embrionário, os cinco miRNAs mais expressos foram hsa-miR-1323, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-24-3p, hsa-miR-361-3p e hsa-miR-500a-5p+501-5p. Não encontramos na literatura estudos mostrando associação destes microRNAs em tumores de células germinativas. Entretanto, o hsa-miR-1323 foi associado à progressão de carcinoma hepatocelular¹¹⁸, à migração celular em adenocarcinoma de pulmão, além de ser um biomarcador de prognóstico precoce¹¹⁹. Quando regulado negativamente, o hsa-miR-1323 promove a migração e invasão de células de câncer de mama¹²⁰. O hsa-miR-28-5p regula a proliferação, invasão e migração de células de glioma¹²¹ e em contrapartida inibe a migração de câncer de mama¹²². Ademais, no câncer de mama, a superexpressão do hsa-miR-24-3p pode conferir resistência ao tamoxifeno durante o curso de tratamento da doença¹²³, promover a migração e proliferação de células no câncer de pulmão¹²⁴. Em carcinoma nasofaríngeo, foi sugerido que o hsa-miR-24-3p pode ser utilizado como um potencial biomarcador prognóstico¹²⁵. O hsa-miR-361-3p associa-se ao câncer de tireoide¹²⁶ e câncer colorretal¹²⁷. O agrupamento hsa-miR-500a-5p+501-5p não foi encontrado na literatura atuando em conjunto como observado neste estudo, mas em separado o hsa-miR-500a-5p é associado à progressão de glioblastomas¹²⁸ e o hsa-miR-501-5p à adenocarcinoma de pulmão¹²⁹.

Os cinco miRNAs mais expressos no grupo histológico disgerminoma foram hsa-miR-223-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-182-5p e hsa-miR-142-3p. Segundo Tanaka e colaboradores, o hsa-miR-142-3p tem uma expressão significativamente maior, em dados de RT-PCR, em seminomas em comparação com testículos normais e desempenha um papel importante na patogênese de TCGs testiculares¹³⁰. Ainda, é associado aos neuroblastoma¹³¹ e glioblastomas¹³². Mallik e colaboradores¹³³ desenvolveram uma estrutura de análise integrativa para identificar assinaturas moleculares em TCGs testiculares e o miR-182-5p foi associado aos dois subtipos: não-seminoma e seminoma¹³³, corroborando com os nossos resultados. Este miRNA tem papel na tumorigênese dos gliomas¹³⁴ demonstrando ampla possibilidade de interpretação e utilização no âmbito de pacientes oncológicos. O hsa-miR-223-3p tem importante papel na tumorigênese e progressão de vários tipos de tumor e sua expressão é maior em TCGs testiculares em comparação com tecidos normais¹³⁵. Está desregulado em diversos tumores sólidos e hematológicos e são capazes de regular o crescimento celular e apoptose em linhagem celular, sugerindo um papel oncogênico em TCG de testículo¹³⁶.

O hsa-miR-146a-5p não foi associado aos TCGs, entretanto, em tecido de câncer de mama, seu nível de expressão foi significativamente elevado, sugerindo promover a proliferação celular¹³⁷. Assim como o miR-146a-5p, o hsa-miR-21-5p não foi descrito na literatura associado aos tumores de células germinativas, porém é relatado que sua superexpressão está correlacionada com mau prognóstico em câncer de pênis¹³⁸ e pode ser uma ferramenta diagnóstica não invasiva para pacientes com câncer de próstata¹³⁹.

Em tumores do seio endodérmico os cinco miRNAs mais expressos foram hsa-miR-122-5p, hsa-miR-302a-5p, hsa-miR-323a-3p, miR-141-3p e miR-200c-3p. Os dois últimos não têm associação com TCG descrita na literatura, mas conforme já mencionado, são associados com a autorrenovação das células germinativas masculinas¹⁰⁴, nefroblastoma¹⁰⁵, câncer de pulmão¹⁰⁶ e colorretal¹⁰⁷. Nenhum trabalho avaliou a associação dos hsa-miR-122-5p e hsa-miR-323-3p em TCGs, mas esses miRNAs foram descritos estarem associados a melanoma^{140, 141} e câncer de pulmão¹⁴² e adenocarcinoma ductal do pâncreas¹⁴³, respectivamente.

Apesar do padrão complexo de expressão dos miRNAs em geral, podemos observar neste estudo que a expressão dos miRNAs nas amostras de TCG gonadais infantis tem alto impacto quando associados à histologia das amostras deixando então a localização do tumor primário e demais características clínicas com menor relevância.

Uma importante limitação deste estudo foi relacionar dados clínicos como recidiva, metástase ao diagnóstico, sobrevida e estadiamento com a expressão de miRNA dentre as amostras, pois seria necessário analisar cada grupo histológico separadamente. Como o tumor é raro, o número total de amostras é pequeno e, fragmentar pela histologia, aumentaria a chance de encontrarmos falsos positivos e a expressão dos miRNAs não seria fidedigna. Assim, não foi possível verificar as medidas de acuidade para cada miRNA superexpresso para determinado tipo histológico. Dessa forma, fazem-se necessárias a obtenção e a avaliação da expressão dos miRNAs em um maior número de pacientes com TCGs.

7 CONCLUSÃO

- Com este estudo foi possível analisar que o perfil de expressão dos microRNA em pacientes pediátricos com TCGs de ovário e testículo são distintos entre as histologias. As análises revelaram um dendrograma com dois agrupamentos distintos, separando as amostras de tecido normal e teratoma maduro e imaturo das amostras de tecido tumoral com componente histológico maligno (seio endodérmico, carcinoma embrionário e disgerminoma).

- A histologia foi a característica de maior impacto neste estudo em relação à expressão dos miRNAs nas amostras de TCGs gonadais infantis ficando as demais características clínicas, como a localização do tumor primário, com menor relevância.

- Doze miRNAs foram superexpressos em comum em amostras testiculares e ovarianas comparadas com as amostras controle-normal, sendo eles: hsa-miR-302d-3p, hsa-miR-302b-3p, hsa-miR-302a-3p, hsa-miR-302c-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-200b-3p e hsa-miR-371a-5p. Dezenove miRNAs foram menos expressos, sendo o hsa-miR-509-3p, hsa-miR-513b/c-3p e hsa-miR-514a-3p os mais significativos. Esses miRNAs podem ser utilizados como biomarcadores para auxiliar no diagnóstico dos pacientes com TCGs de ovário e testículo.

- Seis miRNAs (hsa-miR-371a-3p, hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p, hsa-miR-367-3p, hsa-miR-302a-3p e hsa-miR-302b-3p) foram superexpressos especialmente em tumores malignos, podendo ser potenciais biomarcadores do ponto de vista clínico. O hsa-miR-302b-3p foi o único que apresentou associação significativa com as características clínicas relacionadas ao risco, metástase, marcador AFP pré-cirurgia, recidiva e *status*.

- Foi possível identificar uma assinatura de miRNAs específicos para cada histologia de TCGs, sendo os mais significativos: i) Carcinoma embrionário: hsa-miR-1323, hsa-miR28-5p, hsa-miR24-3p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-500a-5p+501-5p; ii) Seio endodérmico: hsa-miR-122-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-302a-5p, hsa-miR-323a-3p, hsa-miR-141-3p; iii) Disgerminoma: hsa-miR-142-3p, hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-182-5p, hsa-miR-223-3p; iv) Teratoma Imaturo: hsa-miR-199b-5p. Sendo assim, o potencial destas moléculas como biomarcadores de TCGs deverá ser melhor explorado.

REFERÊNCIAS

1. *Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil*. [Internet] Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2019 [cited 23 jan]; Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>.
2. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. *World Cancer Report: Cancer research for cancer prevention*. [Internet] Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020 [cited 21 feb]; Available from: publications.iarc.fr/586.
3. *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil*. [Internet] Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2017 [cited 31 jan]; Available from: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>.
4. *All cancers excluding non melanoma skin cancer*. [Internet] Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2019 [cited 23 jan]; Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/40-All-cancers-excluding-non-melanoma-skin-cancer-fact-sheet.pdf>.
5. *Cancer in adolescents and young adults in Australia*. [Internet] Canberra: Australian Institute of Health and Welfare; 2018 [cited 25 fev]; Available from: <https://www.aihw.gov.au/getmedia/ed22109b-ab23-4273-8d23-7949a8922ea2/aihw-can-110.pdf.aspx?inline=true>.
6. Rodriguez-Galindo C, Friedrich P, Alcasabas P, Antillon F, Banavali S, Castillo L, et al. *Toward the Cure of All Children With Cancer Through Collaborative Efforts: Pediatric Oncology As a Global Challenge*. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):3065-73.
7. Ward ZJ, Yeh JM, Bhakta N, Frazier AL, Atun R. *Estimating the total incidence of global childhood cancer: a simulation-based analysis*. *The Lancet Oncology*. 2019;20(4):483-93.
8. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Pineros M, et al. *Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods*. *Int J Cancer*. 2019;144(8):1941-53.
9. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015*. *Neuro Oncol*. 2018;20(suppl_4):iv1-iv86.
10. Rodriguez-Galindo C, Friedrich P, Morrissey L, Frazier L. *Global challenges in pediatric oncology*. *Curr Opin Pediatr*. 2013;25(1):3-15.
11. *Dia Nacional de Combate ao Câncer Infantil*. [Internet]: Ministério da Saúde; 2020 [updated 26 nov 2020; cited 23 nov]; Available from: <http://bvsmms.saude.gov.br/ultimas-noticias/2566-23-11-dia-nacional-de-combate-ao-cancer-infantil>.

12. Schneider DT, Calaminus G, Koch S, Teske C, Schmidt P, Haas RJ, et al. *Epidemiologic analysis of 1,442 children and adolescents registered in the German germ cell tumor protocols. Pediatric blood & cancer.* 2004;42(2):169-75.
13. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *Embriologia básica* 8a edição ed. **Rio de Janeiro: Elsevier;** 2012.
14. Pierce JL, Frazier AL, Amatruda JF. *Pediatric Germ Cell Tumors: A Developmental Perspective. Adv Urol.* 2018;2018:9059382.
15. *Primordial Germ Cells.* [Internet] 2007 [cited 23 jan]; Available from: <http://medical-embryology.blogspot.com/2007/06/primordial-germ-cells.html>
16. Lopes LF. *Contribuição para o estudo dos tumores de células germinativas na infância: uma (r) evolução no conhecimento, na abordagem terapêutica e na sobrevida nos últimos 100 anos. Livro Docência.* São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.
17. Shaikh F, Murray MJ, Amatruda JF, Coleman N, Nicholson JC, Hale JP, et al. *Paediatric extracranial germ-cell tumours. The Lancet Oncology.* 2016;17(4):e149-e62.
18. Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and practice of pediatric oncology.* 7th ed. **Philadelphia: Wolters Kluwer;** 2016.
19. Maehle AH. *Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. Notes Rec R Soc Lond.* 2011;65(4):359-78.
20. TEILUM G. *Classification of endodermal sinus tumour (mesoblastoma vitellinum) and so-called "embryonal carcinoma" of the ovary. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica.* 1965;64(4):407-29.
21. Berney DM, Looijenga LH, Idrees M, Oosterhuis JW, Rajpert-De Meyts E, Ulbright TM, et al. *Germ cell neoplasia in situ (GCNIS): evolution of the current nomenclature for testicular pre-invasive germ cell malignancy. Histopathology.* 2016;69(1):7-10.
22. Robert J. Kurman MLC, C. Simon Herrington and Robert H. Young. *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs.* 4th Edition ed. **Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC);** 2014.
23. Prat J, Oncology FCoG. *FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. Journal of gynecologic oncology.* 2015;26(2):87-9.
24. Rogers PC, Olson TA, Cullen JW, Billmire DF, Marina N, Rescorla F, et al. *Treatment of children and adolescents with stage II testicular and stages I and II ovarian malignant germ cell tumors: A Pediatric Intergroup Study--Pediatric Oncology Group 9048 and Children's Cancer Group 8891. J Clin Oncol.* 2004;22(17):3563-9.

25. Ries LAG. *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER program, 1975-1995*: **National Cancer Institute**; 1999.
26. Becker C, Graf N, Grabow D, Creutzig U, Reinhardt D, Weyer-Elberich V, et al. *Early deaths from childhood cancer in Germany 1980-2016*. **Cancer Epidemiology**. 2020;65:101669.
27. Kaatsch P. *Epidemiology of childhood cancer*. **Cancer treatment reviews**. 2010;36(4):277-85.
28. Murray MJ, Nicholson JC. *Germ cell tumours in children and adolescents*. **Paediatrics and Child Health**. 2010;20(3):109-16.
29. Poynter JN, Amatruda JF, Ross JA. *Trends in incidence and survival of pediatric and adolescent patients with germ cell tumors in the United States, 1975 to 2006*. **Cancer**. 2010;116(20):4882-91.
30. Fonseca A, Frazier AL, Shaikh F. *Germ cell tumors in adolescents and young adults*. **Journal of oncology practice**. 2019;15(8):433-41.
31. Barr RD, Holowaty EJ, Birch JM. *Classification schemes for tumors diagnosed in adolescents and young adults*. **Cancer**. 2006;106(7):1425-30.
32. Bray F, Ferlay J, Devesa SS, McGlynn KA, Møller H. *Interpreting the international trends in testicular seminoma and nonseminoma incidence*. **Nature clinical practice Urology**. 2006;3(10):532-43.
33. Hennes E, Zahn S, Lopes LF, Schönberger S, Leuschner I, Göbel U, et al. *Molecular genetic analysis of bilateral ovarian germ cell tumors*. **Klinische Pädiatrie**. 2012;224(06):359-65.
34. Euscher ED. *Germ Cell Tumors of the Female Genital Tract*. **Surg Pathol Clin**. 2019;12(2):621-49.
35. Faure-Contier C, Orbach D, Fresneau B, Verite C, Bonneau J, Thebaud E, et al. *Disorder of sex development with germ cell tumors: Which is uncovered first?* **Pediatr Blood Cancer**. 2020;67(4):e28169.
36. Lopes LF. *Protocolo TCG-GALOP-2017*. **São Paulo: Lemar**; 2018.
37. Bonfig W, Hempel M, Teichert-von Luttichau I, Liptay S, Burdach S. *Avoiding harmful procedures in patients with elevated alpha-fetoprotein concentrations: hereditary persistence of alpha-fetoprotein is an important and benign differential diagnosis!* **J Pediatr Hematol Oncol**. 2012;34(7):e301-3.
38. Dieckmann KP, Simonsen-Richter H, Kulejewski M, Anheuser P, Zecha H, Isbarn H, et al. *Serum Tumour Markers in Testicular Germ Cell Tumours: Frequencies of Elevated Levels and Extents of Marker Elevation Are Significantly Associated with Clinical Parameters and with Response to Treatment*. **Biomed Res Int**. 2019;2019:5030349.

39. Blohm ME, Vesterling-Horner D, Calaminus G, Gobel U. *Alpha 1-fetoprotein (AFP) reference values in infants up to 2 years of age. **Pediatr Hematol Oncol.** 1998;15(2):135-42.*
40. Uberti EM, José Mauro; Braga, Antonio; Grillo, Bruno; Viggiano, Maurício; Maestá IA, Jurandyr Moreira; Sun, Sue; Ferreira, Rita de Cássia. *Cuidados com a dosagem da gonadotrofina coriônica humana no seguimento de pacientes com Doença Trofoblástica Gestacional.* [Internet] 2018 [updated 21/02/2020]; Available from: <https://www.febrasgo.org.br/pt/noticias/item/414-cuidados-com-a-dosagem-da-gonadotrofina-coriônica-humana-no-seguimento-de-pacientes-com-doença-trofoblástica-gestacional>.
41. Lopes LF, Macedo CRPD, Aguiar SdS, Barreto JHS, Martins GE, Sonaglio V, et al. *Lowered cisplatin dose and no bleomycin in the treatment of pediatric germ cell tumors: results of the GCT-99 protocol from the Brazilian germ cell pediatric oncology cooperative group. **Journal of Clinical Oncology.** 2016;34(6):603-10.*
42. Frazier AL, Hale JP, Rodriguez-Galindo C, Dang H, Olson T, Murray MJ, et al. *Revised risk classification for pediatric extracranial germ cell tumors based on 25 years of clinical trial data from the United Kingdom and United States. **Journal of Clinical Oncology.** 2015;33(2):195.*
43. Cushing B, Giller R, Cullen JW, Marina NM, Lauer SJ, Olson TA, et al. *Randomized comparison of combination chemotherapy with etoposide, bleomycin, and either high-dose or standard-dose cisplatin in children and adolescents with high-risk malignant germ cell tumors: a pediatric intergroup study--Pediatric Oncology Group 9049 and Children's Cancer Group 8882. **J Clin Oncol.** 2004;22(13):2691-700.*
44. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. *Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. **Nature.** 1965;205:698-9.*
45. Einhorn L, Donohue J. *Combination chemotherapy with cisdiamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin in disseminated testicular cancer. **Ann Intern Med.** 1977;87(3):293-8.*
46. Pinkerton C, Pritchard J, Spitz L. *High complete response rate in children with advanced germ cell tumors using cisplatin-containing combination chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology.** 1986;4(2):194-9.*
47. Schabel JF, Trader M, Laster JW, Corbett T, Griswold JD. *cis-Dichlorodiammineplatinum (II): combination chemotherapy and cross-resistance studies with tumors of mice. **Cancer treatment reports.** 1979;63(9-10):1459-73.*
48. Atkin N, Baker M. *Specific chromosome change, i (12p), in testicular tumours? **The Lancet.** 1982;320(8311):1349.*
49. Jong Bd, Echten Jv, Looijenga LH, Geurts van Kessel A, Oosterhuis JW. *Cytogenetics of the progression of adult testicular germ cell tumors. 1997.*

50. Carcano F, Lengert A, Vidal D, Scapulatempo Neto C, Queiroz L, Marques H, et al. *Absence of microsatellite instability and BRAF (V600E) mutation in testicular germ cell tumors.* **Andrology.** 2016;4(5):866-72.
51. Cárcano FM, Vidal DO, van Helvoort Lengert A, Neto CS, Queiroz L, Marques H, et al. *Hotspot TERT promoter mutations are rare events in testicular germ cell tumors.* **Tumor Biology.** 2016;37(4):4901-7.
52. Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z. *Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer.* **Mutat Res.** 2008;642(1-2):1-13.
53. Martinelli CMdS. *Avaliação do perfil de metilação de genes alvo candidatos em Tumores de Células Germinativas de Testículo.* **Dissertação (Mestrado).** Barretos: Fundação Pio XII; 2015.
54. Hammond SM. *An overview of microRNAs.* **Advanced drug delivery reviews.** 2015;87:3-14.
55. Shivdasani RA. *MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation.* **Blood.** 2006;108(12):3646-53.
56. Das MK, Evensen HS, Furu K, Haugen TB. *miRNA-302s may act as oncogenes in human testicular germ cell tumours.* **Scientific reports.** 2019;9(1):1-8.
57. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. *A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing.* **Cell.** 2007;129(7):1401-14.
58. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs.* **RNA.** 2004;10(12):1957-66.
59. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.* **EMBO J.** 2004;23(20):4051-60.
60. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.* **Nature.** 2003;425(6956):415-9.
61. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing.* **Genes Dev.** 2004;18(24):3016-27.
62. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing.* **Nature.** 2005;436(7051):740-4.
63. Wienholds E, Plasterk RH. *MicroRNA function in animal development.* **FEBS Lett.** 2005;579(26):5911-22.

64. Zeng Y, Cullen BR. *Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells.* **RNA.** 2003;9(1):112-23.
65. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.* **cell.** 2005;120(1):15-20.
66. Xie X, Lu J, Kulbokas E, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, et al. *Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals.* **Nature.** 2005;434(7031):338-45.
67. Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. *Role of microRNAs in translation regulation and cancer.* **World journal of biological chemistry.** 2017;8(1):45.
68. Ryan B, Joilin G, Williams JM. *Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation.* **Front Mol Neurosci.** 2015;8:4.
69. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.* **Nat Rev Cancer.** 2006;6(4):259-69.
70. Djuranovic S, Nahvi A, Green R. *A parsimonious model for gene regulation by miRNAs.* **Science.** 2011;331(6017):550-3.
71. Dykxhoorn DM. *MicroRNAs and metastasis: little RNAs go a long way.* **Cancer research.** 2010;70(16):6401-6.
72. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. *Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs.* **Annual review of biochemistry.** 2010;79:351-79.
73. Jiang X, Tsitsiou E, Herrick SE, Lindsay MA. *MicroRNAs and the regulation of fibrosis.* **The FEBS journal.** 2010;277(9):2015-21.
74. Small EM, Olson EN. *Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology.* **Nature.** 2011;469(7330):336-42.
75. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.* **cell.** 2009;139(5):871-90.
76. Wang X, Zhu Y, Ma Y, Wang J, Zhang F, Xia Q, et al. *The role of cancer stem cells in cancer metastasis: new perspective and progress.* **Cancer epidemiology.** 2013;37(1):60-3.
77. Li H, Li Y, Li Y, Shi X, Chen H. *Circulating microRNA-137 is a potential biomarker for human glioblastoma.* **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2016;20(17):3599-604.
78. Syring I, Bartels J, Holdenrieder S, Kristiansen G, Müller SC, Ellinger J. *Circulating serum miRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p and miR-373-3p) as biomarkers in patients with testicular germ cell cancer.* **The Journal of urology.** 2015;193(1):331-7.

79. Murray MJ, Huddart RA, Coleman N. *The present and future of serum diagnostic tests for testicular germ cell tumours*. **Nature Reviews Urology**. 2016;13(12):715.
80. Hammond SM. *RNAi, microRNAs, and human disease*. **Cancer chemotherapy and pharmacology**. 2006;58(1):63-8.
81. Voorhoeve PM, Le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. *A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors*. **Cell**. 2006;124(6):1169-81.
82. Gillis AJ, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW, Sun Y, Chen C, et al. *High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours*. **J Pathol**. 2007;213(3):319-28.
83. Palmer RD, Murray MJ, Saini HK, van Dongen S, Abreu-Goodger C, Muralidhar B, et al. *Malignant germ cell tumors display common microRNA profiles resulting in global changes in expression of messenger RNA targets*. **Cancer Res**. 2010;70(7):2911-23.
84. Syring I, Bartels J, Holdenrieder S, Kristiansen G, Muller SC, Ellinger J. *Circulating serum miRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-372-3p and miR-373-3p) as biomarkers in patients with testicular germ cell cancer*. **J Urol**. 2015;193(1):331-7.
85. Dieckmann KP, Radtke A, Geczi L, Matthies C, Anheuser P, Eckardt U, et al. *Serum Levels of MicroRNA-371a-3p (M371 Test) as a New Biomarker of Testicular Germ Cell Tumors: Results of a Prospective Multicentric Study*. **J Clin Oncol**. 2019;37(16):1412-23.
86. Murray MJ, Halsall DJ, Hook CE, Williams DM, Nicholson JC, Coleman N. *Identification of microRNAs From the miR-371~373 and miR-302 clusters as potential serum biomarkers of malignant germ cell tumors*. **Am J Clin Pathol**. 2011;135(1):119-25.
87. Badia RR, Abe D, Wong D, Singla N, Savelyeva A, Chertack N, et al. *Real-World Application of Pre-Orchiectomy miR-371a-3p Test in Testicular Germ Cell Tumor Management*. **J Urol**. 2021;205(1):137-44.
88. Port M, Glaesener S, Ruf C, Riecke A, Bokemeyer C, Meineke V, et al. *Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines*. **Mol Cancer**. 2011;10:52.
89. *nCounter® Human v3 miRNA Expression Assay*. [Internet] Seattle: NanoString Technologies, Inc.; 2018 [cited 02 jun]; Available from: <https://www.nanostring.com/products/mirna-assays/mirna-panels>.
90. Veldman-Jones MH, Brant R, Rooney C, Geh C, Emery H, Harbron CG, et al. *Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples*. **Cancer Res**. 2015;75(13):2587-93.
91. Waggott D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. *NanoStringNorm: an extensible R package for the pre-processing of NanoString mRNA and miRNA data*. **Bioinformatics**. 2012;28(11):1546-8.

92. Van Der Maaten L. *Accelerating t-SNE using tree-based algorithms*. **The Journal of Machine Learning Research**. 2014;15(1):3221-45.
93. Norris HJ, Zirkin HJ, Benson WL. *Immature (malignant) teratoma of the ovary: a clinical and pathologic study of 58 cases*. **Cancer**. 1976;37(5):2359-72.
94. Schneider DT, Calaminus G, Gobel U. *Diagnostic value of alpha 1-fetoprotein and beta-human chorionic gonadotropin in infancy and childhood*. **Pediatr Hematol Oncol**. 2001;18(1):11-26.
95. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2020*. **CA Cancer J Clin**. 2020;70(1):7-30.
96. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
97. Nagalla S, Chou JW, Willingham MC, Ruiz J, Vaughn JP, Dubey P, et al. *Interactions between immunity, proliferation and molecular subtype in breast cancer prognosis*. **Genome Biol**. 2013;14(4):R34.
98. Lu Z, Xu Y, Yao Y, Jiang S. *miR-205-5p contributes to paclitaxel resistance and progression of endometrial cancer by downregulating FOXO1*. **Oncol Res**. 2019.
99. Zhou CF, Liu MJ, Wang W, Wu S, Huang YX, Chen GB, et al. *miR-205-5p inhibits human endometriosis progression by targeting ANGPT2 in endometrial stromal cells*. **Stem Cell Res Ther**. 2019;10(1):287.
100. Ma C, Shi X, Guo W, Feng F, Wang G. *miR-205-5p downregulation decreases gemcitabine sensitivity of breast cancer cells via ERp29 upregulation*. **Exp Ther Med**. 2019;18(5):3525-33.
101. Oltra M, Vidal-Gil L, Maisto R, Sancho-Pelluz J, Barcia JM. *Oxidative stress-induced angiogenesis is mediated by miR-205-5p*. **J Cell Mol Med**. 2020;24(2):1428-36.
102. Xu YF, Hannafon BN, Khatri U, Gin A, Ding WQ. *The origin of exosomal miR-1246 in human cancer cells*. **RNA Biol**. 2019;16(6):770-84.
103. Yang F, Xiong H, Duan L, Li Q, Li X, Zhou Y. *MiR-1246 Promotes Metastasis and Invasion of A549 cells by Targeting GSK-3betaMediated Wnt/beta-Catenin Pathway*. **Cancer Res Treat**. 2019;51(4):1420-9.
104. Parker MI, Palladino MA. *MicroRNAs downregulated following immune activation of rat testis*. **Am J Reprod Immunol**. 2017;77(6).
105. Li T, Zhao P, Li Z, Wang CC, Wang YL, Gu Q. *miR-200c-3p Suppresses the Proliferative, Migratory, and Invasive Capacities of Nephroblastoma Cells via Targeting FRS2*. **Biopreserv Biobank**. 2019;17(5):444-51.

106. Wang HY, Liu YN, Wu SG, Hsu CL, Chang TH, Tsai MF, et al. *MiR-200c-3p suppression is associated with development of acquired resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutant non-small cell lung cancer via a mediating epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) process.* **Cancer Biomark.** 2020;28(3):351-63.
107. Ardila HJ, Sanabria-Salas MC, Meneses X, Rios R, Huertas-Salgado A, Serrano ML. *Circulating miR-141-3p, miR-143-3p and miR-200c-3p are differentially expressed in colorectal cancer and advanced adenomas.* **Mol Clin Oncol.** 2019;11(2):201-7.
108. Almstrup K, Lobo J, Morup N, Belge G, Rajpert-De Meyts E, Looijenga LHJ, et al. *Application of miRNAs in the diagnosis and monitoring of testicular germ cell tumours.* **Nat Rev Urol.** 2020;17(4):201-13.
109. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. *A uniform system for microRNA annotation.* **RNA.** 2003;9(3):277-9.
110. Dieckmann KP, Radtke A, Spiekermann M, Balks T, Matthies C, Becker P, et al. *Serum Levels of MicroRNA miR-371a-3p: A Sensitive and Specific New Biomarker for Germ Cell Tumours.* **Eur Urol.** 2017;71(2):213-20.
111. Cho WJ, Shin JM, Kim JS, Lee MR, Hong KS, Lee JH, et al. *miR-372 regulates cell cycle and apoptosis of ags human gastric cancer cell line through direct regulation of LATS2.* **Mol Cells.** 2009;28(6):521-7.
112. Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, et al. *CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer.* **Nucleic Acids Res.** 2010;38(16):5366-83.
113. Yamashita S, Yamamoto H, Mimori K, Nishida N, Takahashi H, Haraguchi N, et al. *MicroRNA-372 is associated with poor prognosis in colorectal cancer.* **Oncology.** 2012;82(4):205-12.
114. Hsieh T-HW, Hsei-Wei; Cheng, Wei-Chung; Wong, Tai-Tong. *PL-005. Small RNA sequencing discloses the Oct4-miR199a/214 pathway contributes in chemoresistance and tumor malignancy of pediatric intracranial germ cell tumors.[Abstract].* **Neuro-Oncology.** 2013.
115. Andolfo I, Liguori L, De Antonellis P, Cusanelli E, Marinaro F, Pistollato F, et al. *The microRNA 199b-5p regulatory circuit involves Hes1, CD15, and epigenetic modifications in medulloblastoma.* **Neuro Oncol.** 2012;14(5):596-612.
116. Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, Marino N, Petrosino G, De Martino D, et al. *MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma.* **PLoS One.** 2009;4(3):e4998.
117. Fattore L, Campani V, Ruggiero CF, Salvati V, Liguoro D, Scotti L, et al. *In Vitro Biophysical and Biological Characterization of Lipid Nanoparticles Co-Encapsulating Oncosuppressors miR-*

199b-5p and miR-204-5p as Potentiators of Target Therapy in Metastatic Melanoma. Int J Mol Sci. 2020;21(6).

118. Zhang F, Yang C, Xing Z, Liu P, Zhang B, Ma X, et al. *LncRNA GAS5-mediated miR-1323 promotes tumor progression by targeting TP53INP1 in hepatocellular carcinoma. Onco Targets Ther.* 2019;12:4013-23.

119. Zhao H, Zheng C, Wang Y, Hou K, Yang X, Cheng Y, et al. *miR-1323 Promotes Cell Migration in Lung Adenocarcinoma by Targeting Cbl-b and Is an Early Prognostic Biomarker. Front Oncol.* 2020;10:181.

120. Xu Y, Liu M. *MicroRNA-1323 downregulation promotes migration and invasion of breast cancer cells by targeting tumour protein D52. J Biochem.* 2020;168(1):83-91.

121. Chen HS, Lu AQ, Yang PY, Liang J, Wei Y, Shang YW, et al. *MicroRNA-28-5p regulates glioma cell proliferation, invasion and migration by targeting SphK1. Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(15):6621-8.

122. Ma L, Zhang Y, Hu F. *miR285p inhibits the migration of breast cancer by regulating WSB2. Int J Mol Med.* 2020;46(4):1562-70.

123. Han X, Li Q, Liu C, Wang C, Li Y. *Overexpression miR-24-3p repressed Bim expression to confer tamoxifen resistance in breast cancer. J Cell Biochem.* 2019;120(8):12966-76.

124. Yan L, Ma J, Zhu Y, Zan J, Wang Z, Ling L, et al. *miR-24-3p promotes cell migration and proliferation in lung cancer by targeting SOX7. J Cell Biochem.* 2018;119(5):3989-98.

125. Ye SB, Zhang H, Cai TT, Liu YN, Ni JJ, He J, et al. *Exosomal miR-24-3p impedes T-cell function by targeting FGF11 and serves as a potential prognostic biomarker for nasopharyngeal carcinoma. J Pathol.* 2016;240(3):329-40.

126. Xia F, Chen Y, Jiang B, Bai N, Li X. *Hsa_circ_0011385 accelerates the progression of thyroid cancer by targeting miR-361-3p. Cancer Cell Int.* 2020;20:49.

127. Liu J, Zhu J, Xiao Z, Wang X, Luo J. *BBOX1-AS1 contributes to colorectal cancer progression by sponging hsa-miR-361-3p and targeting SH2B1. FEBS Open Bio.* 2020.

128. Liu Z, Su D, Qi X, Ma J. *MiR500a5p promotes glioblastoma cell proliferation, migration and invasion by targeting chromodomain helicase DNA binding protein 5. Mol Med Rep.* 2018;18(3):2689-96.

129. Chen S, Zhou YC, Chen Y, Chen XB, Li GJ, Lei YJ, et al. *[Expression profile of miR-501-5p in lung adenocarcinoma patients from Xuanwei area]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2017;37(3):354-9.

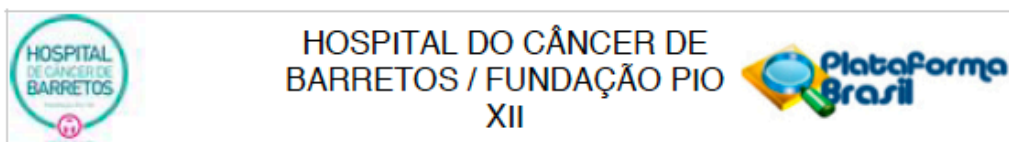
130. Tanaka K, Kondo K, Kitajima K, Muraoka M, Nozawa A, Hara T. *Tumor-suppressive function of protein-tyrosine phosphatase non-receptor type 23 in testicular germ cell tumors is lost upon overexpression of miR142-3p microRNA.* **J Biol Chem.** 2013;288(33):23990-9.
131. Li J, Ma L. *MiR-142-3p Attenuates Oxygen Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Injury by Targeting FBXO3 in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells.* **World Neurosurg.** 2020;136:e149-e57.
132. Xu S, Wei J, Wang F, Kong LY, Ling XY, Nduom E, et al. *Effect of miR-142-3p on the M2 macrophage and therapeutic efficacy against murine glioblastoma.* **J Natl Cancer Inst.** 2014;106(8).
133. Mallik S, Qin G, Jia P, Zhao Z. *Molecular signatures identified by integrating gene expression and methylation in non-seminoma and seminoma of testicular germ cell tumours.* **Epigenetics.** 2021;16(2):162-76.
134. Xue J, Zhou A, Wu Y, Morris SA, Lin K, Amin S, et al. *miR-182-5p Induced by STAT3 Activation Promotes Glioma Tumorigenesis.* **Cancer Res.** 2016;76(14):4293-304.
135. Ozata DM, Li X, Lee L, Liu J, Warsito D, Hajeri P, et al. *Loss of miR-514a-3p regulation of PEG3 activates the NF-kappa B pathway in human testicular germ cell tumors.* **Cell Death Dis.** 2017;8(5):e2759.
136. Liu J, Shi H, Li X, Chen G, Larsson C, Lui WO. *miR2233p regulates cell growth and apoptosis via FBXW7 suggesting an oncogenic role in human testicular germ cell tumors.* **Int J Oncol.** 2017;50(2):356-64.
137. Gao W, Hua J, Jia Z, Ding J, Han Z, Dong Y, et al. *Expression of miR-146a-5p in breast cancer and its role in proliferation of breast cancer cells.* **Oncol Lett.** 2018;15(6):9884-8.
138. Pinho JD, Silva GEB, Teixeira Junior AAL, Belfort MRC, Mendes JM, Cunha IWD, et al. *MIR-107, MIR-223-3P and MIR-21-5P Reveals Potential Biomarkers in Penile Cancer.* **Asian Pac J Cancer Prev.** 2020;21(2):391-7.
139. Danarto R, Astuti I, Umbas R, Haryana SM. *Urine miR-21-5p and miR-200c-3p as potential non-invasive biomarkers in patients with prostate cancer.* **Turk J Urol.** 2020;46(1):26-30.
140. Li J, Zhao R, Fang R, Wang J. *[miR-122-5p inhibits the proliferation of melanoma cells by targeting NOP14].* **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.** 2018;38(11):1360-5.
141. Byrnes CC, Jia W, Alshamrani AA, Kuppa SS, Murph MM. *miR-122-5p Expression and Secretion in Melanoma Cells Is Amplified by the LPAR3 SH3-Binding Domain to Regulate Wnt1.* **Mol Cancer Res.** 2019;17(1):299-309.
142. Fan JM, Zheng ZR, Zeng YM, Chen XY. *MiR-323-3p Targeting Transmembrane Protein with EGF-Like and 2 Follistatin Domain (TMEFF2) Inhibits Human Lung Cancer A549 Cell*

Apoptosis by Regulation of AKT and ERK Signaling Pathways. **Med Sci Monit.** 2020;26:e919454.

143. Wang C, Liu P, Wu H, Cui P, Li Y, Liu Y, et al. *MicroRNA-323-3p inhibits cell invasion and metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma via direct suppression of SMAD2 and SMAD3.* **Oncotarget.** 2016;7(12):14912-24.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do potencial papel dos microRNAs como biomarcadores dos tumores de células germinativas de ovário e testículo na infância.

Pesquisador: ANA GLENDA SANTAROSA VIEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 01657418.3.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Fundação Pio XII

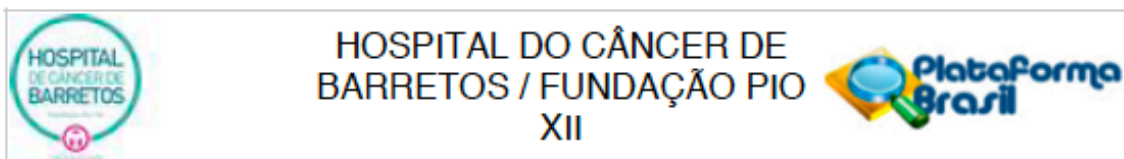
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.007.924

Apresentação do Projeto:**RESUMO:**

Os tumores de células germinativas (TCG) são neoplasias benignas ou malignas derivados de células germinativas primordiais e que podem ocorrer em sítios gonadais e extragonadais. Como a transformação maligna pode ocorrer em vários níveis da histogênese, com a célula germinativa já diferenciada ou ainda pluripotente, os TCGs também podem ser de vários tipos histológicos, de acordo com o grau de diferenciação celular. Os principais marcadores biológicos dos TCGs são alfafetoproteína (AFP) e a fração beta da gonadotrofina coriônica (BHCG). Novas ferramentas precisam ser desenvolvidas com a finalidade de se obter um diagnóstico precoce e preciso que possa nortear o melhor esquema terapêutico, bem como definir o prognóstico de cada caso, uma vez que não existe um marcador de prognóstico específico para esse tipo tumoral. Muitos estudos demonstram de forma clara que os miRNAs são úteis para o manejo clínico do TCGT, especialmente por monitorar a terapia de vigilância e a doença residual após a quimioterapia. Sendo assim, trata-se de um estudo retrospectivo onde serão avaliados miRNAs em blocos de parafina provenientes de pacientes com tumores de células germinativas de ovário e testículo tratado pelos Protocolos Brasileiros de TCG 99 e 2008, com objetivo de avaliar a expressão dos microRNAs em tumores de células germinativas de ovário e testículo pediátricos e relacionar com os dados clínico-patológicos.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Beirro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-8600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.007.924

INTRODUÇÃO:

Os tumores de células germinativas (TCG) são neoplasias benignas ou malignas derivados de células germinativas primordiais e que podem ocorrer em sítios gonadais e extragonadais. Apesar das profundas diferenças entre os subtipos histológicos do TCG, a designação comum reflete a suposta célula comum de origem destes tumores, a célula germinativa primordial. Como a transformação maligna pode ocorrer em vários níveis da histogênese, com a célula germinativa já diferenciada ou ainda pluripotente, os TCGs também podem ser de vários tipos histológicos, de acordo com o grau de diferenciação celular. Se malignos, são divididos em dois grandes tipos histológicos: seminomatosos e não seminomatosos. Tumores de células germinativas representam 3,5% de todos os cânceres infantis que ocorrem antes dos 15 anos de idade. Cerca de 900 novos casos de tumores malignos de células germinativas são diagnosticados nos EUA a cada ano em pacientes mais jovens mais de 20 anos de idade. Dois picos distintos em incidência são relatados, um em crianças pequenas (0 a 4 anos) e outro desde o início da puberdade até a idade adulta jovem (11–35 anos). Os TCGs são um grupo heterogêneo que apresentam diferentes achados clínicos e histológicos. Diversas classificações histológicas foram utilizadas para a distinção dos TCGs e para uniformização da nomenclatura, sendo apresentado abaixo a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) e a subclassificação proposta pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas (AFIP): I – Germinoma (testículo = seminoma; ovário = disgerminoma; extra-gonadal = germinoma) II – Tumor de Seio Endodérmico III – Carcinoma Embrionário IV – Coriocarcinoma V – Misto (Combinação de I a IV) VI – Teratoma A – Maduro B – Imaturo graus 1 – 3 C – Maduro ou Imaturo combinados com neoplasias do grupo I a IV No banco de dados do Grupo Brasileiro, somando todas as faixas etárias em relação a incidência da localização primária observa-se que o local mais comum são as gônadas com 41,7% em ovários e 25,6% em testículos. Sítios extragonadais aparecem em ordem decrescente de frequência sacrococcígeos (14,4%), mediastino (5,6%) e retroperitônio (4,4%). Os principais marcadores biológicos dos TCGs são alfafetoproteína (AFP) e a fração beta da gonadotrofina coriônica (BHCG). Os tumores com elementos do saco vitelínico produzem AFP e os derivados do tecido trofoblástico produzem a BHCG. Os teratomas maduros não secretam AFP nem BHCG e os germinomas podem ou não secretar AFP e BHCG. Estes marcadores são encontrados em cerca de 70-80% dos tumores não seminomatosos e são úteis no acompanhamento pré e pós cirúrgico podendo mostrar grau de resposta ou mesmo progressão de doença durante o tratamento quimioterápico. No entanto, novas ferramentas precisam ser desenvolvidas com a finalidade de se obter um diagnóstico precoce e preciso que possa nortear o melhor esquema terapêutico, bem como definir o

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: csp@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

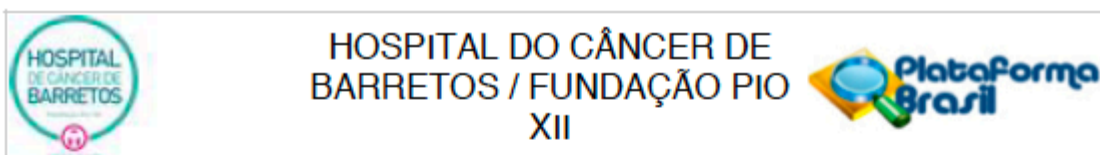


Continuação do Parecer: 3.007.924

INTRODUÇÃO:

Os tumores de células germinativas (TCG) são neoplasias benignas ou malignas derivados de células germinativas primordiais e que podem ocorrer em sítios gonadais e extragonadais. Apesar das profundas diferenças entre os subtipos histológicos do TCG, a designação comum reflete a suposta célula comum de origem destes tumores, a célula germinativa primordial. Como a transformação maligna pode ocorrer em vários níveis da histogênese, com a célula germinativa já diferenciada ou ainda pluripotente, os TCGs também podem ser de vários tipos histológicos, de acordo com o grau de diferenciação celular. Se malignos, são divididos em dois grandes tipos histológicos: seminomatosos e não seminomatosos. Tumores de células germinativas representam 3,5% de todos os cânceres infantis que ocorrem antes dos 15 anos de idade. Cerca de 900 novos casos de tumores malignos de células germinativas são diagnosticados nos EUA a cada ano em pacientes mais jovens mais de 20 anos de idade. Dois picos distintos em incidência são relatados, um em crianças pequenas (0 a 4 anos) e outro desde o início da puberdade até a idade adulta jovem (11–35 anos). Os TCGs são um grupo heterogêneo que apresentam diferentes achados clínicos e histológicos. Diversas classificações histológicas foram utilizadas para a distinção dos TCGs e para uniformização da nomenclatura, sendo apresentado abaixo a classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) e a subclassificação proposta pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas (AFIP): I – Germinoma (testículo = seminoma; ovário = disgerminoma; extra-gonadal = germinoma) II – Tumor de Seio Endodérmico III – Carcinoma Embrionário IV – Coriocarcinoma V – Misto (Combinação de I a IV) VI – Teratoma A – Maduro B – Imaturo graus 1 – 3 C – Maduro ou Imaturo combinados com neoplasias do grupo I a IV No banco de dados do Grupo Brasileiro, somando todas as faixas etárias em relação a incidência da localização primária observa-se que o local mais comum são as gônadas com 41,7% em ovários e 25,6% em testículos. Sítios extragonadais aparecem em ordem decrescente de frequência sacrococcígeos (14,4%), mediastino (5,6%) e retroperitônio (4,4%). Os principais marcadores biológicos dos TCGs são alfafetoproteína (AFP) e a fração beta da gonadotrofina coriônica (BHCG). Os tumores com elementos do saco vitelínico produzem AFP e os derivados do tecido trofoblástico produzem a BHCG. Os teratomas maduros não secretam AFP nem BHCG e os germinomas podem ou não secretar AFP e BHCG. Estes marcadores são encontrados em cerca de 70-80% dos tumores não seminomatosos e são úteis no acompanhamento pré e pós cirúrgico podendo mostrar grau de resposta ou mesmo progressão de doença durante o tratamento quimioterápico. No entanto, novas ferramentas precisam ser desenvolvidas com a finalidade de se obter um diagnóstico precoce e preciso que possa nortear o melhor esquema terapêutico, bem como definir o

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.007.924

prognóstico de cada caso, uma vez que não existe um marcador de prognóstico específico para esse tipo tumoral. Diversos mecanismos epigenéticos estão envolvidos com a indução e/ou progressão tumoral, incluindo os microRNAs (miRNAs), que são pequenos RNAs endógenos não codificantes (noncoding RNA), filogeneticamente conservados e formados em média por uma sequência de 18 a 25 nucleotídeos. O papel funcional dos miRNAs na saúde e doença têm sido parcialmente elucidado e a literatura infere que os miRNAs provavelmente atuam como genes supressores de tumor ou oncogenes. Atualmente, o tratamento de todos os tipos histológicos dos tumores de células germinativas é dividido de acordo com o estadiamento tumoral. Para a maioria dos protocolos de tratamento os estádios I são considerados baixo risco e são tratados somente com cirurgia, sem adjuvância. Mais recentemente os pacientes Estádios II, III e com tumores gonadais Estádio IV com idade inferior a 11 anos, são tratados como risco intermediário, onde recebem quimioterapia (duas drogas) e seguem com reavaliações com exames de imagem e marcadores sorológicos periodicamente. Os pacientes com tumores gonadais Estádio IV com idade maior ou igual a 11 anos e extra-gonadais Estádio IV de qualquer idade são classificados como Alto Risco e serão tratados com quimioterapia (três drogas) e reavaliados com marcadores tumorais sorológicos e com exames de imagens e caso seja necessária uma discussão para seguimento do tratamento com transplante autólogo. Muitos estudos demonstram de forma clara que os miRNAs são úteis para o manejo clínico do TCGT, especialmente por monitorar a terapia de vigilância e a doença residual após a quimioterapia. Embora haja trabalhos sinalizando o papel dos microRNAs em relação aos TCGs, não há até o momento nenhum estudo que avalie a expressão dos miRNAs em TCG pediátricos. Conhecendo e definindo diferentes miRNAs com íntima relação com os tumores de células germinativas pediátricos poderá ser possível relacioná-los aos diferentes tipos histológicos, recidivas tumorais e sobrevida. Além disso, a avaliação dos níveis de expressão dos miRNAs em pacientes pediátricos poderá dar origem a uma nova dimensão de biomarcadores no diagnóstico, sendo potencialmente específicos e sensíveis.

HIPÓTESE:

A expressão alterada dos microRNAs pode ser utilizada como ferramenta de diagnóstico, identificação do tipo histológico e prognóstico de paciente pediátricos com tumores de células germinativa de testículo e ovário.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO:

Endereço:	Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	CEP:	14.784-400
Bairro:	Dr. Paulo Prata		
UF:	SP	Município:	BARRETOS
Telefone:	(17)3321-0347	Fax:	(17)3321-6600
		E-mail:	cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 3.007.924

- Avaliar a expressão dos microRNAs em tumores de células germinativas de ovário e testículo pediátricos e relacionar com os dados clinicopatológicos.

OBJETIVO SECUNDÁRIO:

- Analisar a expressão dos microRNAs em amostras de TCGs de ovário e testículo pediátricos por meio da plataforma de Nanostring;
- Analisar prontuários a fim de obter informações clínico-patológicas (evolução clínica, recidiva, sobrevida e resposta ao tratamento) de pacientes infantis (zero a 18 anos) portadores de tumor de células germinativas de ovário e testículo tratados ou em tratamento no Hospital de Câncer Infanto-Juvenil de Barretos, incluídos nos Protocolos Brasileiros de TCG 99 e 2008.
- Relacionar a expressão dos microRNAs com dados clínico-patológicos como tipo histológico, recidivas tumorais e sobrevida em tumores de células germinativas de ovário e testículo infantis;
- Comparar a expressão dos microRNAs com a presença dos marcadores biológicos já consagrados nos TCGs de ovário e testículo infantis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS:

Trata-se de um estudo de risco mínimo, limitado à eventual possibilidade de quebra de confidencialidade. No entanto os pesquisadores se comprometem a tomar todas as medidas necessárias para isso não ocorra. A amostra tumoral proveniente do acervo do Departamento de Patologia do HCB será avaliada por um patologista antes de serem realizados os cortes para análise molecular. Será tomado o cuidado para que não se esgote todo o material armazenado de modo que não prejudique eventual necessidade futura de utilização da amostra. Caso haja necessidade de esgotamento do material, o paciente será excluído do estudo, a menos que já tenha vindo a óbito, o que não implicará em consequências clínicas.

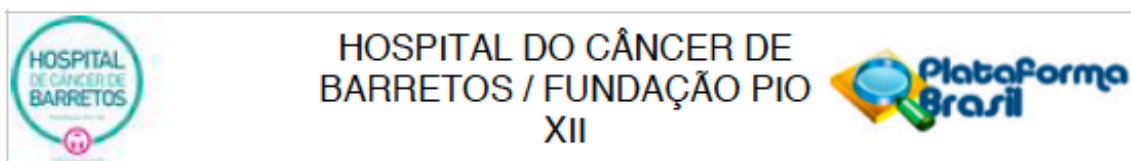
BENEFÍCIOS:

Não haverá benefícios aos participantes do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- O projeto é de importância para o campo de pesquisa em tumores germinativos.
- Serão incluídos todos os portadores de câncer de tumores de células germinativas de ovário e testículo tratados no Hospital de Câncer Infantojuvenil de Barretos.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.007.924

- A estimativa da amostra do estudo é de cerca de 88 participantes – amostra por conveniência. Um total de 49 pacientes portadores de tumor de ovário e 29 pacientes portadores de tumor de testículo, além de 5 amostras controle adjacente de tecido ovariano e 5 amostras controle adjacente de tecido testicular.
- Todo o material serão Blocos de parafina.

CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE:

Para a inclusão, todos os critérios devem estar presentes:

- Diagnóstico histopatológico de tumor de células germinativas de ovário e testículo em biópsia tumoral pela equipe de patologia do Hospital de Amor de Barretos/SP;
- Disponibilidade de informações quanto à evolução clínica, recidiva, sobrevida e resposta ao tratamento nos prontuários arquivados no SAME da instituição envolvida.
- Disponibilidade de material parafinado;
- Idade entre zero e 18 anos, 11 meses e 29 dias.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados corretamente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

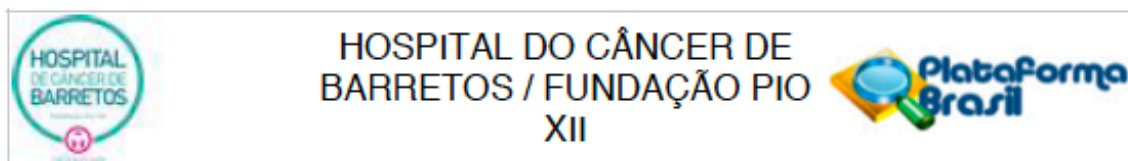
Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Amor de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta -se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 08/05/2019.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6800 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

Continuação do Parecer: 3.007.924

4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1692/2018.

OBSERVAÇÃO: Devido a Lei da Biodiversidade (Lei 13.123/15) tornou-se obrigatório o cadastro de todas as pesquisas que de alguma forma tiveram acesso ao patrimônio genético brasileiro e/ou conhecimento tradicional associado, na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen (<https://sisgen.gov.br/paginas/login.aspx>).

Quais atividades deverão ser cadastradas?

I - acesso a patrimônio genético brasileiro ou conhecimento tradicional associado dentro do país realizado por pessoa natural ou jurídica nacional, pública ou privada;

II - acesso a patrimônio genético brasileiro ou conhecimento tradicional associado por pessoa jurídica sediada no exterior associada a instituição nacional de pesquisa científica e tecnológica, pública ou privada;

III - acesso a patrimônio genético brasileiro ou conhecimento tradicional associado realizado no exterior por pessoa natural ou jurídica nacional, pública ou privada;

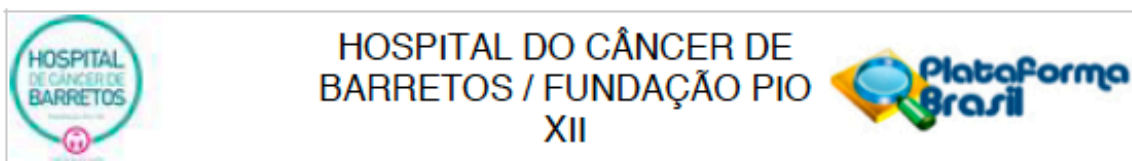
IV - remessa de amostra de patrimônio genético brasileiro para o exterior com a finalidade de acesso, nas hipóteses II e III;

V - envio de amostra que contenha patrimônio genético brasileiro por pessoa jurídica nacional, pública ou privada, para prestação de serviços no exterior como parte de pesquisa ou desenvolvimento tecnológico.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1202688.pdf	17/10/2018 18:00:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ProjetoTCG.docx	17/10/2018 17:59:21	ANA GLENDA SANTAROSA	Aceito

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.007.924

Investigador	ProjetoTCG.docx	17/10/2018 17:59:21	ANA GLENDA SANTAROSA	Aceito
Outros	ORCAMENTO_PATOLOGIA.pdf	17/10/2018 17:51:37	ANA GLENDA SANTAROSA	Aceito
Outros	MABINeCADASTRO.pdf	17/10/2018 17:48:56	ANA GLENDA SANTAROSA	Aceito
Outros	DECLARACAO_ORCAMENTARIA.pdf	04/10/2018 17:34:55	ANA GLENDA SANTAROSA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO.pdf	04/10/2018 17:33:30	ANA GLENDA SANTAROSA	Aceito
Outros	ResponsabilidadePesquisador.pdf	19/09/2018 15:55:09	ANA GLENDA SANTAROSA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 08 de Novembro de 2018

Assinado por:

Maicon Fernando Zanon da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
 UF: SP Município: BARRETOS
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

ANEXO B - Ficha de coleta de dados do estudo

<i>Estudo do potencial papel dos microRNAs como biomarcadores dos tumores de células germinativas de ovário e testículo na infância.</i>	
<i>Page 1</i>	
Estudo do potencial papel dos microRNAs como biomarcadores dos tumores de células germinativas de ovário e testículo na infância.	
Record ID	_____
Dados pessoais	
Nome do Paciente	_____
Iniciais	_____
Registro da Instituição	_____
Naturalidade cidade	_____
Naturalidade estado	<input type="radio"/> Acre <input type="radio"/> Alagoas <input type="radio"/> Amapá <input type="radio"/> Amazonas <input type="radio"/> Bahia <input type="radio"/> Ceará <input type="radio"/> Distrito Federal <input type="radio"/> Espírito Santo <input type="radio"/> Goiás <input type="radio"/> Maranhão <input type="radio"/> Mato Grosso <input type="radio"/> Mato Grosso do Sul <input type="radio"/> Minas Gerais <input type="radio"/> Pará <input type="radio"/> Paraíba <input type="radio"/> Paraná <input type="radio"/> Pernambuco <input type="radio"/> Piauí <input type="radio"/> Rio de Janeiro <input type="radio"/> Rio Grande do Norte <input type="radio"/> Rio Grande do Sul <input type="radio"/> Rondônia <input type="radio"/> Roraima <input type="radio"/> Santa Catarina <input type="radio"/> São Paulo <input type="radio"/> Sergipe <input type="radio"/> Tocantins
Data de Nascimento	_____
DATA DA ADMISSÃO	_____
Idade	_____

Etnia	<input type="radio"/> BRANCO <input type="radio"/> NEGRO/PRETO <input type="radio"/> PARDO/MULATO <input type="radio"/> AMARELO <input type="radio"/> INDÍGENA <input type="radio"/> IGNORADO
SEXO	<input type="radio"/> FEMININO <input type="radio"/> MASCULINO
Dados clínicos - Diagnóstico	
DATA DO DIAGNOSTICO	_____
LOCALIZAÇÃO	<input type="radio"/> OVÁRIO <input type="radio"/> TESTÍCULO
LATERALIDADE DO TUMOR	<input type="radio"/> Direto <input type="radio"/> Esquerdo <input type="radio"/> Bilateral
ESTADIAMENTO OVÁRIO	<input type="radio"/> I <input type="radio"/> II <input type="radio"/> III <input type="radio"/> IV
COG	<input type="radio"/> I <input type="radio"/> II <input type="radio"/> III <input type="radio"/> III-X <input type="radio"/> IV
Observacao	_____
ESTADIAMENTO TESTÍCULO	<input type="radio"/> I <input type="radio"/> II <input type="radio"/> III <input type="radio"/> IV
ESTADIO I	<input type="radio"/> IA <input type="radio"/> IB <input type="radio"/> IC1 <input type="radio"/> IC <input type="radio"/> NAO SE APLICA
ESTADIO II	<input type="radio"/> IIA <input type="radio"/> IIB
ESTADIO III	<input type="radio"/> IIIA1 <input type="radio"/> IIIA2 <input type="radio"/> IIIB <input type="radio"/> IIIC
ESTADIO IV	<input type="radio"/> IVA <input type="radio"/> IVB

RISCO	<input type="radio"/> BAIXO RISCO <input type="radio"/> RISCO INTERMÉDIO <input type="radio"/> ALTO RISCO
Metástase ao diagnóstico	<input type="checkbox"/> NÃO <input type="checkbox"/> PULMÃO <input type="checkbox"/> HEPÁTICA <input type="checkbox"/> ÓSSEA <input type="checkbox"/> SNC <input type="checkbox"/> GANGLIONAR <input type="checkbox"/> OUTROS
Metástase ao dx - outras	_____
SE GANGLIONAR	<input type="checkbox"/> RETROPERITONEAL <input type="checkbox"/> INGUINAL <input type="checkbox"/> MEDIASTINAL <input type="checkbox"/> OUTRO
SE OUTRO GANGLIONAR	_____
Histologia	
HISTOLOGIA	<input type="radio"/> SEIO ENDODÉRMICO <input type="radio"/> CORIOCARCINOMA <input type="radio"/> CARCINOMA EMBRIONÁRIO <input type="radio"/> TERATOMA MADURO <input type="radio"/> TERATOMA IMATURO <input type="radio"/> DISGERMINOMA/SEMINOMA <input type="radio"/> TCG MISTO <input type="radio"/> CONTROLE NORMAL
Tumor misto: seio endodermico	_____ (Em %)
Tumor misto: coriocarcinoma	_____ (Em %)
Tumor misto: Carcinoma embrionario	_____ (Em %)
Tumor misto: Seminoma	_____ (Em %)
Tumor misto: Teratoma puro	_____ (Em %)
Tumor misto: Teratoma imaturo I	_____ (Em %)

Tumor misto: Teratoma Imaturo II

Tumor misto: Teratoma Imaturo III

(Em %)

Se teratoma imaturo, qual

- Teratoma imaturo com Grau nao definido
 Teratoma imaturo I
 Teratoma imaturo II
 Teratoma imaturo III

NÚMERO DA PATOLOGIA

Tratamento

PROTOCOLO DO ESTUDO

- TCG 91
 TCG 99
 TCG 2008
 TCG-GALOP 2017
 OUTRO

SE OUTRO, DESCREVER

CIRURGIA

- nenhuma
 ressecção completa
 ressecção parcial
 biópsia

Marcadores pre cirurgia

ALFAPETOPROTEÍNA PRÉ CIRURGIA - VALOR

ALFAPETOPROTEINA PRÉ CIRURGIA

- NORMAL
 AUMENTADA
 IGNORADO

BETAHCG PRÉ CIRURGIA - VALOR

BETAHCG PRÉ CIRURGIA

- NORMAL
 AUMENTADA
 IGNORADO

DHL PRÉ CIRURGIA - VALOR

DHL PRÉ CIRURGIA

- NORMAL
 AUMENTADA
 IGNORADO

Marcadores pos cirurgia

ALFAFETOPROTEINA PÓS CIRURGIA - VALOR _____

ALFAFETOPROTEINA PÓS CIRURGIA

- NORMAL
 AUMENTADA
 IGNORADO

BETAHCG PÓS CIRURGIA - VALOR _____

BETAHCG PÓS CIRURGIA

- NORMAL
 AUMENTADA
 IGNORADO

DHL PÓS CIRURGIA - VALOR _____

DHL PÓS CIRURGIA

- NORMAL
 AUMENTADA
 IGNORADO

Quimioterapia

QUIMIOTERAPIA

- NAO
 SIM

PROTOCOLO QT UTILIZADO

- RI (99 ou 2008) - PE
 RI (99 ou 2008) - PE+IVB
 (99) AR PEI 3 ciclos
 (99) AR PEI 6 ciclos
 (2008) AR PEI 5 ciclos
 (2008) AR PEI 3 ciclos + 3 TIPs
 (2017) RI
 (2017) AR
 BEP
 Carboplastina
 EP (adulto)
 Outro
 (99) AR PEI 4 ciclos

Marcadores pre 1 ciclo

REALIZADO MARCADORES PRE 1 CICLO

- Nao
 Sim

ALFAFETOPROTEINA PRÉ 1 CICLO QT _____

ALFAFETOPROTEINA PRÉ 1 CICLO QT

- NORMAL
 AUMENTADA
 NAO REALIZADO

BETAHCG PRÉ 1 CICLO QT _____

BETAHCG PRÉ 1 CICLO QT	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
DHL PRÉ 1 CICLO QT	_____
DHL PRÉ 1 CICLO QT	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
Marcadores pre 2 ciclo	
REALIZADO MARCADORES PRE 2 CICLO	<input type="radio"/> NAO <input type="radio"/> SIM
ALFAPETOPROTEINA PRÉ 2 CICLO QT	_____
ALFAPETOPROTEINA PRÉ 2 CICLO QT	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
BETAHCG PRÉ 2 CICLO QT	_____
BETAHCG PRÉ 2 CICLO QT	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
DHL PRÉ 2 CICLO QT	_____
DHL PRÉ 2 CICLO QT	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
Marcadores pre 3 ciclo	
REALIZADO MARCADORES PRE 3 CICLOS	<input type="radio"/> NAO <input type="radio"/> SIM
ALFAPETOPROTEINA PRÉ 3 CICLO QT	_____
ALFAPETOPROTEINA PRÉ 3 CICLO QT	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
BETAHCG PRÉ 3 CICLO QT	_____
BETAHCG PRÉ 3 CICLO QT	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO

Page 7	
DHL PRÉ 3 CICLO QT	_____
DHL PRÉ 3 CICLO QT	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
Reavaliação	
FEITA REAVALIACAO	<input type="radio"/> NAO <input type="radio"/> SIM
RESPOSTA DA REAVALIACAO - TERMINO TRATAMENTO	<input type="radio"/> Sem remissao <input type="radio"/> Remissao completa (>75%) <input type="radio"/> Remissao parcial (< 75%) <input type="radio"/> Progressao
REALIZADO MARCADORES NA REAVALIACAO	<input type="radio"/> Nao <input type="radio"/> Sim
ALFAPETOPROTEINA REAVALIACAO	_____
ALFAPETOPROTEINA REAVALIACAO	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
BETAHCG REAVALIACAO	_____
BETAHCG REAVALIACAO	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
DHL REAVALIACAO	_____
DHL REAVALIACAO	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
DATA TERMINO DE TERAPIA	_____
Acompanhamento pos termino de terapia	
RECIDIVA/RECAIDA	<input type="radio"/> Nao <input type="radio"/> Sim
DATA DA RECIDIVA	_____
Tempo ate a Recidiva (meses)	_____

Page 8	
AP DA RECIDIVA	<input type="radio"/> SEIO ENDODÉRMICO <input type="radio"/> CORIOCARCINOMA <input type="radio"/> CARCINOMA EMBRIONÁRIO <input type="radio"/> TERATOMA MADURO <input type="radio"/> TERATOMA IMATURO <input type="radio"/> DISGERMINOMA/SEMINOMA <input type="radio"/> TCG MISTO <input type="radio"/> OUTRO <input type="radio"/> CONTROLE NORMAL
SE OUTRO, QUAL	_____
Tumor misto: seio endodermico	_____
	(Em %)
Tumor misto: coriocarcinoma	_____
	(Em %)
Tumor misto: Carcinoma embrionario	_____
	(Em %)
Tumor misto: Seminoma	_____
	(Em %)
Tumor misto: Teratoma puro	_____
	(Em %)
Tumor misto: Teratoma imaturo I	_____
	(Em %)
Tumor misto: Teratoma Imaturo II	_____
	(Em %)
Tumor misto: Teratoma Imaturo III	_____
Se teratoma imaturo, qual	<input type="radio"/> Teratoma imaturo com Grau nao definido <input type="radio"/> Teratoma imaturo I <input type="radio"/> Teratoma imaturo II <input type="radio"/> Teratoma imaturo III
LOCAL RECIDIVA/RECAIDA	<input type="checkbox"/> Pulmao <input type="checkbox"/> Fgado <input type="checkbox"/> Linfonodo <input type="checkbox"/> Local primario <input type="checkbox"/> Outros
SE OUTROS LOCAIS, QUAL	_____

REALIZADO MARCADORES NA RECIDIVA	<input type="radio"/> Nao <input type="radio"/> Sim
ALFAFETO RECIDIVA	_____
ALFAFETO RECIDIVA	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
BETAHCG RECIDIVA	_____
BETAHCG RECIDIVA	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
DHL RECIDIVA	_____
DHL RECIDIVA	<input type="radio"/> NORMAL <input type="radio"/> AUMENTADA <input type="radio"/> NAO REALIZADO
PROTOCOLO TRATAMENTO RECIDIVA	<input type="radio"/> RI (99 ou 2008) - PE <input type="radio"/> RI (99 ou 2008) - PE+IVB <input type="radio"/> (99) AR PEI 3 ciclos <input type="radio"/> (99) AR PEI 6 ciclos <input type="radio"/> (2008) AR PEI 5 ciclos <input type="radio"/> (2008) AR PEI 3 ciclos + 3 TIPs <input type="radio"/> (2017) RI <input type="radio"/> (2017) AR <input type="radio"/> BEP <input type="radio"/> Carboplastina <input type="radio"/> EP (adulto) <input type="radio"/> Outro <input type="radio"/> (99) AR PEI 4 ciclos
SE OUTRO, QUAL	_____
STATUS	
STATUS	<input type="radio"/> Vivo sem doenca <input type="radio"/> Vivo com doenca <input type="radio"/> Obito por cancer <input type="radio"/> Obito outras causas <input type="radio"/> Morte por toxicidade
SE OBITO POR OUTRAS CAUSAS, DETALHAR	_____
DATA ULTIMA INFORMACAO OU OBITO	_____
Tempo ate o obito ou ultima informacao (meses)	_____

<i>Page 10</i>	
PERDA DE SEGUIMENTO	<input type="radio"/> Nao <input type="radio"/> Sim
Exclusao	<input type="radio"/> Nao <input type="radio"/> Sim
Motivo da exclusao	<input type="radio"/> Material utilizado nao era do tumor primario <input type="radio"/> Extracao foi repetida e a nova é a que sera utilizada
OBSERVACAO	<hr/>

ANEXO C - Protocolo de extração de RNA de parafina

Protocolo Extração de RNA de Parafina

Kit utilizado: RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation. Ref AM1975 – Invitrogen.

Raspagem das lâminas

A raspagem deve ser feita no máximo um dia antes.

O patologista avalia a área tumoral de cada tecido e faz a marcação da área tumoral na lâmina corada com HE.

Colocar uma lâmina em cima da outra, com a parte que será coletada para cima, sobrepondo com a lâmina de HE embaixo.

Coletar a região de parafina com agulha ou bisturi, depende do tamanho do tecido. Agulha para tecidos menores, bisturi para tecidos maiores.

*As agulhas e bisturis ficam na gaveta do armário perto da sala de Pré-PCR.

Extração RNA

Antes de iniciar a extração, reservar os equipamentos termociclador (última bancada) e vácuo (sala Pré-PCR). Reservar os 2 termocicladores por causa das diferenças de temperatura de incubação (50°C e 80°C). Ligar o vácuo.

- As primeiras etapas são realizadas na capela de exaustão.
- Adicionar 1mL Xilol (Xilol PA – ONU 1307 – Classe3 – GEIII – ALLAKIMIA). Colocar lavando a parede do tubo. *O Xilol fica no armário perto da capela.
- Vortex e Spin
- Aquecer no termociclador por 3 minutos a 50°C e 500 rpm
- Centrifugar 14.000 rpm por 5 minutos em TA. Posicionar os tubos na centrifuga com a ponta para fora, para facilitar visualização do pellet. *Centrifuga bancada 14.
- Remover Xilol com p1000
- Repetir = Adicionar novamente 1mL Xilol. Aquecer no termociclador por 3 minutos a 50°C e 500 rpm. Centrifugar 14.000 rpm por 5 minutos em TA. Remover Xilol com p1000 e p100.
- Adicionar 1mL de Etanol.

- Vortex e Centrifugar 14.000 rpm por 5 minutos em TA
- Descartar sobrenadante com p1000.
- Repetir = Adicionar 1mL de Etanol. Vortex e Centrifugar 14.000 rpm por 5 minutos em TA. Descartar sobrenadante com p1000 e p100.
- Colocar os tubos com a tampa aberta no vácuo em temperatura média (40-45°C) por 10 minutos. Para iniciar, apertar Concentration ON. Quando começar a fazer barulho, inicia-se a contagem do tempo.
- Adicionar Digestion Buffer de acordo com o tamanho da área. ≤40µl – 100ul/40-80µl – 200 µl. Sempre colocamos 200µl. *O buffer fica dentro do kit, na bancada da pediatria.
- Adicionar 4µl de Protease. *Protease fica no freezer 7, dentro da sala Pré-PCR, gaveta 2, dentro de uma caixa preta.
- Vortex e Spin. Após spin bater levemente no tubo para o pellet subir um pouco.
- Incubar no termociclador por 3 horas a 50°C e 500 rpm.
- Ligar o outro termociclador e colocar temperatura para 80°C.
- Incubar no termociclador por 15 minutos a 80°C e 500 rpm.
- Preparar mix para digestão de acordo com o número de amostras + 10% de margem de erro de pipetagem. Preparar solução no momento do uso.

	100µl	200µl
Isolation Additive	120µl	240µl
Ethanol	275µl	550µl
Total	395µl	790µl

- Preparar coluna nos tubos.
- Tirar tubos da incubação e adicionar 790µl do mix de digestão em cada amostra. Se a amostra estiver turva significa que tem tecido que não foi digerido. Então, o ideal é dar um spin para o tecido não digerido formar um leve pellet.
- Colocar a solução na coluna. A coluna comporta somente 700µl. Então, colocar primeiro 500µl.
- Centrifugar 10.000 rpm por 1 minuto. Descartar eluído.
- Adicionar o restante da solução na coluna. Centrifugar 10.000 rpm por 1 minuto. Descartar eluído.

- Adicionar 700µl da solução Wash1. Ao abrir o kit, deve-se adicionar 42ml de Etanol no Wash1.
- Centrifugar 10.000 rpm por 1 minuto.
- Adicionar 500µl da solução Wash2/3. Ao abrir o kit, deve-se adicionar 48ml de Etanol no Wash2/3.
- Centrifugar 10.000 rpm por 1 minuto.
- Descartar eluído e centrifugar novamente a 10.000 rpm por 1 minuto para remover os resíduos.
- Preparar o mix de DNase. Preparar solução de acordo com o número de amostras + 10% de margem de erro de pipetagem.

10x DNase Buffer	6µl
DNase	4µl
Nuclease free water	50µl
Total	60µl

*DNase buffer e DNase ficam juntos com a Protease no freezer 7, dentro da sala Pré-PCR, gaveta 2, dentro de uma caixa preta.

- Adicionar 60µl do DNase mix em cada coluna. Aplicar a solução próximo ao filtro da coluna, mas sem encostar.
- Incubar 30 minutos em TA.
- Adicionar 700µl de Wash1.
- Incubar 1 minuto em TA.
- Centrifugar 10.000 rpm por 1 minuto. Descartar o eluído.
- Adicionar 500µl de Wash2/3.
- Centrifugar 10.000 rpm por 1 minuto. Descartar o eluído.
- Lavar novamente com 500µl de Wash2/3. Centrifugar 10.000 rpm por 1 minuto.
- Centrifugar 10.000 rpm por 1 minuto para remover resíduos.
- Nomear novos tubos. Passar a coluna para os tubos novos.
- Eluir as amostras em 30µl de água nuclease free. Aplicar a solução próximo ao filtro da coluna, mas sem encostar.
- Incubar 1 minuto em TA.
- Centrifugar por 1 minuto em velocidade máxima (13.4 rpm).
- Quantificar RNA no NanoDrop e Qubit.

Quantificação no NanoDrop

O NanoDrop fica na sala de PCR. Anotar o nome, data e horário no caderno de usuários.

- Abrir o software Nanodrop. Em *Type* selecionar RNA.
- Limpar o bico do aparelho com água destilada e papel.
- Colocar 1µl de água destilada no bico e clicar em *Blank*.
- Limpar o bico e colocar novamente 1µl de água destilada. Clicar em *Measure* para certificar que o aparelho está correto.
- O software vai pedir para salvar a quantificação. Salvar na pasta específica do projeto.
- Limpar o bico e aplicar 1µl da amostra. Em *Sample ID* colocar o nome da amostra e clicar em *Measure*.
- Fazer todas as leituras e armazenar amostras no -80°C.

nCounter miRNA Expression Assay

- Após quantificar as amostras de RNA no NanoDrop e Qubit, colocar os dados em uma planilha. A quantificação será considerada a do Qubit. O kit utiliza 100ng/µl e é necessário usar 3ul da amostra. Dessa forma, fazer os cálculos para 34ng/µl de RNA. *Geralmente é feito para um volume final de 10µl, depende da concentração da amostra. A diluição é feita nos strips.
- Em tubo eppendorf, preparar diluição 1:500 do miRNA Assay Controls (1µl do miRNA Assay Controls + 499µl de água DEPC/nuclease free).
- Preparar Anneling master mix:

Anneling buffer	13µl
nCounter miRNA Taq Reagent	26µl
Diluição 1:500 miRNA Assay Controls	6,5µl
Total	45,5µl

- Homogeneizar fazendo up and down.
- Pegar um novo strip e colocar 3,5µl do mix em cada poço.
- Adicionar 3µl da diluição do RNA
- Homogeneizar batendo suavemente na parede dos tubos.
- Spin e colocar no termociclador:

Protocol	Temp	Time
Annealing Protocol	94°C	1 minutos
	65°C	2 minutos
	45°C	10 minutos
	48°C	Hold
	Total Time	13 minutes

- Enquanto isso, preparar o Ligation master mix com 19,5µl PEG e 13µl Ligation buffer. O PEG é muito viscoso, portanto, deve ser pipetado lentamente.
- Retirar as amostras do termociclador e mantê-lo ligado.
- Adicionar 2,5µl do Ligation master mix. Caso o volume do mix não seja suficiente por causa do erro de pipetagem, fazer uma nova diluição com 1,95µl PEG e 1,3µl Ligation buffer.
- Incubar as amostras a 48°C por 5 minutos.

Após os 5 minutos, não retirar as amostras do termociclador. Abrir a tampa cuidadosamente e adicionar 1µl de Ligase. Tampar os tubos e iniciar o protocolo de Ligação:

Protocol	Temp	Time
Ligation Protocol	48°C	3 minutos
	47°C	3 minutos
	46°C	3 minutos
	45°C	5 minutos
	65°C	10 minutos
	4°C	Hold
	Total Time	24 minutes

- Retirar a strip do termociclador e adicionar 1µl Ligation Clean-up Enzyme.
- Colocar novamente a strip no termociclador no protocolo de purificação:

Protocol	Temp	Time
Purification Protocol	37°C	1 hour
	70°C	10 minutos
	4°C	Hold
	Total Time	1 hour 10 minutes

- Enquanto isso descongelar em gelo a Reporter CodeSet e a Capture ProbeSet que estão no - 80°C. Se no momento do uso o Reporter CodeSet estiver precipitado, colocar a 75°C por 10 minutos.
- Após o ciclo de purificação, adicionar 40µl de água DEPC/nuclease free.
- Desnaturar as amostras em termociclador 85°C por 5 minutos e em seguida colocar imediatamente no gelo.
- Fazer um mix adicionando 130µl do hybridization buffer no tubo da Reporter CodeSet, que já contém 130µL.
- Homogeneizar up and down.
- Pegar novar strips e numerá-las.
- Adicionar 20µl do mix em cada tubo da strip.
- Adicionar 5µl da amostra miRNA Sample Preparation Protocol em cada tubo.
- Incubar em termociclador 65°C por 21 horas. *Se o RNA não estiver bom, incubar por 24-25 horas.
- No dia seguinte, logo pela manhã, retirar Prep e cartucho da câmara fria e freezer, respectivamente.
- Colocar ponteiras, 2 strip, lixo e o cartucho no equipamento e pedir para calibrar. Faz isso para certificar que o equipamento está funcionando corretamente.
- Centrifugar as Pre-Plate a 2.000 rpm por 2 minutos.
- Retirar as amostras do termociclador. Pegar a strip que vem no kit (ela tem uma duas dobras e a primeira dobra deve ser a amostra 1).
- Transferir todo o conteúdo da strip que ficou incubada 21 horas para a nova strip numerada. O volume é 30ul, mas para garantir que tudo será pipetado, colocar 33µl na pipeta.
- Colocar as duas Pre-Plates no equipamento com o código de barra voltado para nós.
- Colocar o cartucho com código de barra para direita e fechar a portinha cuidadosamente.
- Start. Demora aproximadamente 3 horas
- Em seguida, transferir a strip para fazer a leitura no outro equipamento.