

# A GENÉTICA MOLECULAR DE SARCOMAS DE PARTES MOLES E SUA APLICAÇÃO À CLÍNICA

*The molecular genetics of soft tissue sarcomas and its clinical application*

ANDREW J.G. SIMPSON\*

*Sarcomas de partes moles, como outros tumores humanos, são causados por mutações em genes supressores de tumores e oncogenes. Entre eles alguns, como p53 por exemplo, são freqüentemente detectados na forma mutada em sarcomas e outros tumores humanos. De outro lado, há várias mutações altamente específicas para determinados sarcomas que podem servir como marcadores diagnósticos de alto valor. Exemplos de mutações de potencial diagnóstico incluem a translocação entre PAX3 e FKHR em rabdomiossarcoma alveolar; a translocação entre EWS e FLI-1 em tumores neuroectodérmicos periféricos primitivos e EWS e ATF-1 e sarcomas de células claras. Todas essas translocações podem ser detectadas por metodologias moleculares e que podem constituir um componente importante de repertório diagnóstico futuro.*

**Palavras-chave:** Sarcoma, oncogenes, genes supressores de tumores.

**Keywords:** Sarcoma, oncogenes, tumor suppressor genes.

\* Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

## Introdução

Câncer é uma doença causada diretamente por lesões (mutações) no material genético da célula, o DNA. Essas lesões acontecem ao longo da vida e são causadas por agentes ambientais (mutógenos) ou por erros intrínsecos de replicação celular. As mutações responsáveis pelo desenvolvimento de câncer acontecem em dois tipos de genes: nos genes supressores de tumores e nos oncogenes. Outras mutações, que podem acontecer em qualquer parte do genoma, também têm um efeito deletério mas não contribuem para desenvolvimento de câncer. A combinação dos genes mutados varia junto com o tipo de tumor e o tecido onde se estabeleceu. Alguns genes supressores de tumor e oncogenes são freqüentemente alterados em vários tipos de tumor e provavelmente têm um papel fundamental no processo de malignização. Alterações em outros genes são restritas a determinados tipos de tumor e então são de valor diagnóstico. A combinação de mutações também define o desenvolvimento do tumor e tumores de melhor ou pior prognóstico podem ter per-

**Endereço para correspondência:** Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, Rua Prof. Antonio Prudente, 109 - 4º Andar - CEP 01509-010 São Paulo - SP.

fis de mutação diferentes. Assim, análise das mutações de um tumor pode fornecer informações prognósticas.

Durante as últimas duas décadas enormes avanços têm sido feitos em nossa compreensão da base genética do câncer e o conceito que um tumor pode ser identificado e caracterizado a partir das suas lesões genéticas está sendo aceito não só por pesquisadores da área básica mas também pela classe médica. Assim, a biologia molecular tem um papel crescente no diagnóstico e prognóstico de tumores. Neste capítulo serão resumidos os conceitos gerais da base genética de câncer, as mutações associadas aos sarcomas de partes moles, e as possibilidades do uso da informação genética na conduta clínica desses tumores.

### **A base genética do câncer**

Os genes supressores de tumores codificam proteínas de várias funções que coletivamente têm o papel de evitar a acumulação de mutações no genoma da célula e a replicação de células alteradas. De outro lado, oncogenes codificam proteínas que controlam diretamente a proliferação celular e que são responsáveis pelo crescimento desordenado de células malignas. Em geral, mutações estão presentes num tumor tanto em genes supressores de tumores quanto em oncogenes. O conceito atual é que o tumor se desenvolve de forma sequencial, com a acumulação das mutações levando à progressão de lesões alteradas mas não malignas (displasias e metaplasias) ao câncer metastático (21). Já foram identificados cerca de dez genes supressores de tumores e cem oncogenes humanos envolvidos nesse processo de malignização.

Existem vários tipos de mutação que podemos dividir em duas classes básicas: mutações inativantes (recessivas) e mutações ativantes (dominantes). A forma mais simples da primeira classe, associada aos genes supressores de tumor, é a perda de todo ou parte de um cromossoma contendo o gene. Assim, a cópia do gene simplesmente não existe mais. Frequentemente, uma das duas cópias de um gene supressor de tumor está inativada desta maneira e, assim, há perda da região relevante de um dos dois cromossomas. Esta situação chama-se "perda de heterozigiosidade" (em inglês, loss of heterozygosity ou LOH), uma vez que é detectada pela perda de um de dois marcadores polimórficos localizados dentro ou perto do gene de interesse. Também podem acontecer deleções menores que inativam um gene. Uma deleção inativante pode ser constituída por um simples nucleotídeo uma vez que isso interrompe totalmente a fase de leitura do gene e impossibilita a síntese de uma proteína funcional. Também as deleções podem ser de qualquer tamanho maior como 10, 25, 37 nucleotídeos, etc. Uma proteína não funcional também pode ser produzida quando houver uma substituição de

um nucleotídeo por outro, resultando na terminação da fase de leitura ou na troca de um aminoácido, numa região-chave de um gene. Alterações em somente um nucleotídeo chamam-se mutações pontuais. Em genes supressores de tumores é freqüente a inativação de uma cópia do gene por LOH e da outra por uma mutação pontual, ou deleção pequena. Substituições também podem representar mutações ativantes, a segunda classe de mutação, quando a proteína resultante não está inativada mas tem sua atividade alterada. Mutações desse tipo são freqüentes em oncogenes. Uma outra mutação que resulta na ativação de oncogenes é o simples aumento do número de cópias do gene por amplificação. Nesse caso a proteína é normal mas presente em quantidades muito maiores na célula. A última forma de mutação a ser considerada aqui é a translocação. Translocações são trocas recíprocas de partes de dois cromossomas que resultam em cromossomas híbridos. Assim, por exemplo, parte de cromossoma 2 é trocada com parte do cromossoma 13. Uma translocação desta forma é denominada t(2;13). A localização precisa do ponto de translocação é também incluída na denominação da translocação pelos números do bandeamento citogenético onde a quebra acontece. O número inclui a letra para o braço curto e que para o braço longo do cromossoma. Assim, uma denominação completa de uma translocação seria t(2;13)(q35;q14), por exemplo, que significa uma translocação entre os dois braços longos dos cromossomas 2 e 13, onde os pontos de quebra (ou, em inglês, breakpoints) são q35 e q14. Essa translocação é característica de rhabdomyosarcomas e está descrita abaixo em detalhe. Como qualquer tipo de mutação, nem todas as translocações estão envolvidas no desenvolvimento de câncer e translocações importantes envolvem oncogenes. Através da translocação o oncogene está acoplado a um outro gene, normalmente com um promotor forte ou constitutivo, e assim sua expressão está desregulada e a quantidade de proteína aumentada significativamente, além de alterações na estrutura da proteína. Inicialmente, translocações foram descritas em relação ao câncer no caso de leucemias, mas elas também têm um papel muito importante em sarcomas.

Normalmente indivíduos nascem com as duas cópias de cada gene no genoma na forma normal. As mutações acontecem durante a vida do indivíduo e são denominadas mutações somáticas e os tumores que elas causam tumores somáticos. Tumores somáticos representam a grande maioria dos tumores humanos. Entretanto, existem indivíduos que herdaram de seus pais uma mutação numa cópia de um gene. Mutações hereditárias deste tipo em genes supressores de tumores são responsáveis pela predisposição hereditária ao câncer ou câncer familiar. Uma vez que a inativação da atividade de um gene supressor de tumor precisa de mutações nas duas cópias, a presença de uma mutação na linhagem

germinativa, e então no genoma de todas as células, aumenta muito a chance de inativação total por mutação da outra cópia. O resultado é, em famílias afetadas, uma incidência aumentada de tumores que também normalmente acontecem em indivíduos mais jovens do que tumores somáticos.

Referências excelentes e bastante objetivas da genética molecular básica e sua aplicação à medicina, que podem fornecer uma visão muito mais completa da base genética do câncer do que é possível aqui, são: "Genes in Medicine" (54) and "Recombinant DNA" (72).

### **Mutações associadas aos sarcomas de partes moles**

Grandes avanços têm acontecido durante os últimos cinco anos em relação à identificação e análise das mutações associadas aos sarcomas de partes moles. Esses avanços permitiram uma melhor compreensão da biologia dos tumores e do relacionamento entre tumores de tipos diferentes, além de possibilitar abordagens diagnósticas mais exatas e informativas. Serão resumidos aqui os principais avanços da área com ênfase nas mutações que têm maior relevância clínica. Em primeiro lugar, serão consideradas mutações em sarcomas da forma geral e, em seguida, mutações associadas a sarcomas específicos.

### **Considerações gerais de alterações genéticas associadas aos sarcomas de partes moles**

#### **I - Genes supressores de tumores**

Ao contrário de alguns oncogenes, que são alterados somente em tipos de sarcomas específicos, alterações em genes supressores de tumores, com uma possível exceção descrita abaixo, são características comuns dos sarcomas.

O gene supressor de tumor mais estudado de modo geral em tumores humanos é o *p53*. O gene *p53* codifica uma fosfoproteína nuclear, *p53*, que, conforme vários estudos têm mostrado, é capaz de suprimir o fenótipo neoplásico em células *p53* deficientes. (NB: na nomenclatura internacionalmente aceita, nomes em itálico, por exemplo *p53*, se referem aos genes e nomes sem itálico, por exemplo *p53*, a seus produtos protéicos). A atividade supressora da *p53* provavelmente depende de sua atividade como fator de controle de transcrição de genes relacionados à proliferação celular, reparo de danos no DNA da célula e apoptose (9). A expressão do *p53* é induzida por DNA danificado e o efeito global da sua expressão é de evitar a replicação de células com mutações. Na ausência de *p53* funcional, uma célula tende a acumular mutações rapidamente. Uma alta percentagem de tumores humanos tem mutações em ambas as cópias do *p53*, sendo este o gene mais freqüentemente alterado em câncer (28,38). De

modo geral, mutação em *p53* é um fator de prognóstico ruim e, aos poucos, a detecção de tais mutações está sendo incorporada na avaliação prognóstica clínica de tumores humanos. Em carcinomas, as mutações em *p53* são dominantes e a grande maioria das mutações são aquelas que ativam a proteína e consistem de mutações pontuais ativantes (26). É de grande interesse que em sarcomas aproximadamente metade das mutações são da forma inativante com a perda de proteína funcional através de deleções ou rearranjos (2,22,37,47,67). Isto sugere que o papel de *p53* em sarcomas pode ser diferente do que em carcinomas.

A freqüência de mutações *p53* varia entre os sarcomas analisados e conforme a metodologia empregada. Entretanto, alterações em *p53* têm sido detectadas em tumores ou linhagens celulares em 33% e 34% dos casos de sarcoma de Ewing (ES) (33,35), entre 30% e 65% dos casos de histiocitoma fibroso maligno (MFH) (2,37,67), 45% de casos de rabdomiossarcoma (RMS) (22,47 e 23) e 30% dos casos de lipossarcoma (LS) (2,37). Fica claro que *p53* tem um papel de importância considerável em sarcomas de partes moles. Compatível com esta observação é o fato de que em famílias com a síndrome Li-Fraumeni, causada por uma mutação em *p53* na linhagem germinativa e que predispõe a desenvolvimento precoce de cânceres, aproximadamente 25% dos tumores são sarcomas das partes moles, dos quais a maioria são rabdomiossarcomas (7,39).

Apesar da alta freqüência das mutações em *p53* em sarcomas das partes moles, nem todos esses tumores são afetados. Nos sarcomas livres de mutações em *p53*, é possível que outros genes supressores de tumores são alterados, às vezes, ainda não caracterizados. Um provável exemplo disso se encontra no rabdomiossarcoma da forma embrional (eRMS), que consistentemente exibe LOH no cromossoma 11p15 (34,56,57). Há forte evidência que 11p15 contém um gene supressor de tumores, vinda da observação da transferência de fragmentos cromossômicos dessa região que têm a capacidade de induzir perda de tumorigenicidade em células de rabdomiossarcoma embrional (32,42). Além disso, o envolvimento do gene *Rb* também tem sido estudado em sarcomas das partes moles. *Rb* foi o primeiro gene supressor de tumor descoberto e é diretamente responsável por retinoblastoma. O gene é expresso em todos os tecidos humanos e a proteína codificada tem um papel central no controle do ciclo celular. A proteína de retinoblastoma é freqüentemente alterada numa grande variedade de tumores humanos, incluindo sarcomas em tumores com ou sem mutações em *p53* (55).

#### **II - Oncogenes**

Uma outra base de malignidade em tumores sem mutações em *p53* envolve um gene funcionalmente relacionado,

o *MDM2*. Esse gene é incluído na classe de oncogenes e estudos em sarcomas têm mostrado uma alta frequência de sua amplificação (48). O produto do *MDM2* interage com a proteína p53 e inibe sua habilidade de estimular a expressão gênica como um fator de transcrição (46). Assim, a amplificação (e superexpressão subsequente) do *MDM2* pode ter o mesmo efeito do que mutações em p53. O primeiro estudo de inter-relacionamento de mutações em p53 e amplificação de *MDM2* em sarcomas de partes moles (lipossarcomas e histiocitoma fibroso maligno) mostrou uma complementaridade entre as duas alterações e, dos 24 tumores estudados, 8 apresentaram mutações em p53 e 8 exibiram amplificação de *MDM2*. Entretanto, as duas alterações não foram presentes no mesmo tumor (37). Num trabalho subsequente, com um número muito elevado de sarcomas de partes moles (11), 76 em 207 tumores mostraram quantidades elevadas de *MDM2*, 56 em 211 apresentaram evidência de mutação em p53 e em 22 casos as duas alterações foram detectáveis. Nessa análise, as alterações foram correlacionadas com a sobrevida das pacientes. É interessante que a presença de uma das duas alterações já mostra um risco elevado de morte em comparação com pacientes livres das mutações estudadas, e que a presença das duas alterações implica em um risco mais elevado ainda, sem sobreviventes depois de 48 meses.

Além de *MDM2* outros oncogenes também são frequentemente alterados em sarcomas de partes moles. Em vários casos, as alterações são na forma de translocações e específicas para tipos de sarcoma diferentes. Essas mutações serão descritas detalhadamente abaixo. Entretanto, existem outras alterações em oncogenes de relevância nos sarcomas de partes moles em geral. Os oncogenes que estão mais frequentemente alterados em tumores humanos são da família *ras*. Mutações nessa família de genes não foram ainda amplamente estudadas em sarcomas, mas um estudo com rabdomiossarcoma, por exemplo, detectou mutações em N-*ras* ou K-*ras* em 35% dos casos (65). Os genes *ras* são alterados por mutações pontuais, mas a maioria dos outros oncogenes conhecidos é alterada por amplificação, resultando em superexpressão e níveis elevados dos seus produtos protéicos. Dos oncogenes desse tipo, um exemplo de grande importância é a família *myc*. A amplificação de N-*myc* e C-*myc* também tem sido observada em sarcomas de partes moles como rabdomiossarcoma, sarcoma de Ewing (ES) e tumores primitivos periféricos neuroectodermas (pNET) (17,45). No caso de ES e pNET a expressão de c-*myc* foi a mais alta. No caso de RMS, c-*myc* não foi alterado e N-*myc* foi amplificado entre 5 e 20 vezes na forma alveolar (aRMS) mas não na forma embrional (eRMS). Interessantemente, a amplificação de N-*myc* em aRMS mostrou uma correlação significativa com um prognóstico ruim, uma vez que 4 em 4

dos casos com amplificação foram a óbito, mas somente 5 em 9 casos sem amplificação chegaram a esse fim. No estudo de ES e pNET, onde foi observada a amplificação de N-*myc* e c-*myc*, também foram investigados vários outros oncogenes com o intuito de comparar o padrão de expressão de oncogenes entre estas duas formas de sarcoma. Os resultados mostraram que o padrão nos dois casos foi quase idêntico, o que é compatível com o conceito atual de que ES é uma forma da categoria pNET. No estudo, a expressão dos oncogenes c-*myb*, *ets-1*, *rdc-1* e *dbl* mas não c-*sis* foi detectada.

O estudo da ativação de oncogenes em sarcomas de partes moles está continuando. Novos oncogenes específicos para esse tipo de tumor já foram descobertos, por exemplo o SAS, (Sarcoma Amplified Sequence) que está frequentemente amplificado em MFH e lipossarcomas (61).

No estudo do papel dos oncogenes em sarcomas de partes moles, sem dúvida, a observação mais importante é a presença de translocações altamente específicas para determinados tipos de tumores que ativam a expressão de uma variedade de oncogenes. Translocações estão também associadas a leucemias e linfomas mas não são encontradas em carcinomas. Essas translocações são consideradas a base genética fundamental dos sarcomas e, em função de sua especificidade para tipos de sarcoma diferentes, serão consideradas em detalhe abaixo.

## Mutações e outros marcadores genéticos específicos para sarcomas de partes moles

### 1 - Rabdomiossarcoma (RMS)

Rabdomiossarcomas (RMS) representam 50% dos sarcomas de partes moles em crianças e adolescentes e uma percentagem alta de tais sarcomas em adultos. Os rabdomiossarcomas se dividem em duas formas de prognósticos contrastantes: a forma embrionária (eRMS), que é curável em cerca de 80% dos casos, e a forma alveolar (aRMS), que é curável em menos de 40% dos casos, pela terapia em uso atualmente. As duas formas da doença têm características genéticas bem distintas. A característica importante do eRMS é o LOH no cromossoma 11p, típico da inativação de um gene supressor de tumor, mencionado acima (56,57). Em contraste a outros genes supressores de tumores, que são alterados numa proporção dos tumores, o LOH em 11p de eRMS é uma característica consistente desse sarcoma. A importância disso é que esse gene é provavelmente a base da doença e a sua alteração serve como um importante marcador diagnóstico diferencial, uma vez que nunca acontece em casos de aRMS. A característica importante do aRMS é uma translocação entre cromossomas 2 e 13, definida como t(2;13)(q35;q14), que é detectável na maioria dos casos de aRMS (15,58,70,74). A translocação resulta na fusão de um

membro da família de genes "forkhead" (FKHR) no cromossoma 13 com o gene PAX3 no cromossoma 2 (4,23,59). Tanto FKHR quanto PAX3 são fatores de transcrição e supõe-se que a proteína híbrida, que resulta da translocação, funcione como um oncogene pela ativação inapropriada dos alvos de transcrição do PAX3. Nos casos de aRMS que não têm t(2;13) uma outra translocação tem sido observada: t(1;13)(q36;q14) que resulta na fusão de PAX7 com FKNR (13). PAX7 tem uma sequência muito semelhante ao PAX3, e considera-se provável que as duas variantes de translocação produzam proteínas que ativam os mesmos genes envolvidos na patogênese do aRMS (66). Alterações genéticas consistentes, que têm correlação com a histologia da doença, já foram identificadas há algum tempo no campo da oncologia hematológica, mas não com tumores sólidos. Assim, a identificação e caracterização das translocações t(2;13) e t(1;13) em aRMS e LOH em 11p em eRMS representam grandes avanços para a genética molecular de câncer e permitirão alterações fundamentais no diagnóstico dessa doença (veja abaixo). Nesse contexto, uma outra característica genética, que não envolve genes supressores de tumores nem oncogenes, é importante na identificação de RMS. RMS são detectados com base na evidência morfológica de diferenciação miogênica. Uma abordagem mais objetiva e sensível da identificação seria a detecção da expressão de genes específicos aos tecidos musculares. Um gene fundamental na diferenciação miogênica normal e neoplásica é o *MyoD1*, que controla a expressão gênica responsável pela diferenciação (27). Em consequência, a expressão desse gene é detectável na grande maioria dos RMS das duas formas e serve como um marcador diagnóstico para esse sarcoma (18). Nos casos negativos para *MyoD1*, a expressão de outros genes - *Myf5* e *miogenina*, - podem ser detectadas e também usadas como base diagnóstica (8,75).

## II - Sarcoma de Ewing extra-ósseo e tumor neuroectodérmico periférico primitivo

Várias linhas de pesquisa elaboradas durante a última década têm demonstrado que o sarcoma de Ewing é simplesmente a forma mais comum e menos diferenciada dos tumores neuroectodérmicos periféricos primitivos (pNETs) (10,41,50). Assim, o sarcoma de Ewing extra-ósseo é um pNET de partes moles. Outros tumores, como o tumor de Askin e neuroblastoma adulto, também são componentes desse sistema de pNETs, que é conhecido como a família Ewing de tumores. Toda essa família de tumores contém uma translocação altamente característica, t(11;22)(q24;q12) em cerca de 85% dos casos (3,16,19,25,29,68,71,73). A translocação cria uma proteína de fusão entre os genes *EWS* e *FLI-1* (6,31,52). *FLI-1* é um oncogene da família ETS que

não está normalmente expresso em tecidos extra-hemopoiéticos em contraste com o *EWS*, que tem expressão ubíqua e constitutiva. A translocação então, é responsável pela expressão constitutiva do oncogene e pelo desenvolvimento do tumor (43,44). A translocação t(11;22) é detectável em cerca de 85% dos pNETs. Dos tumores negativos para essa translocação, a metade tem uma outra translocação t(21;22)(q22;q11) (62,76). Nesse caso, a fusão consiste do *EWS* com *ERG*, um outro gene da família ETS. As duas proteínas de fusão são funcionalmente equivalentes e têm atividade de ativação de transcrição. Vale notar que tanto RMS quanto ES têm duas translocações que são equivalentes em induzir em malignização. Assim, é possível que haja uma redundância de oncogenes no cromossoma humano com mais de um gene com o mesmo potencial de formar translocações tumorigênicas.

Uma observação recente demonstrou que sarcomas bifenotípicos com diferenciação miogênica e neugênica também contêm t(11;22)(q24;q12) (63). Isso sugere que esse tipo de sarcoma está relacionado com a família Ewing. Os sarcomas nos quais a translocação foi detectada foram inicialmente classificados como aRMS; entretanto, translocações associadas com aRMS não foram detectadas. Estas observações argumentam fortemente para o fato de que a classificação dos sarcomas pediátricos de partes moles deve considerar informações genéticas além de informações morfológicas. Achados preliminares sugerem que até 10% dos sarcomas classificados como aRMS são, na realidade, da família Ewing, uma vez que contêm a fusão t(11;22) característica (63).

## III - Tumor de pequenas células redondas

Esse tumor, que é citologicamente semelhante, na maioria dos casos, ao sarcoma de Ewing extra-ósseo e outros tumores de células pequenas, é definido por uma translocação do *EWS* com *WT1*, t(11;22)(p13;q12)36, (44). O gene *WT1* codifica um fator de transcrição originalmente descoberto por causa de sua associação com o tumor de Wilms. Essa translocação serve para distinguir esse tipo de tumor dos pNETs, principalmente em casos onde a desmoplasia característica está ausente.

## IV - Sarcoma de células claras

O gene *EWS* é também envolvido numa outra translocação associada com o sarcoma de células claras t(12;22)(q13;q12) (76). Nesse caso, a translocação cria uma proteína de fusão com um fator de transcrição, *ATF-1*, que não forma parte da família ETS. Até agora, relativamente poucos sarcomas desse tipo foram estudados quanto à presença da translocação; aparentemente, ela acontece em mais de 80% dos casos. Essa translocação sugere que existe um relacionamento estreito

entre o sarcoma de células claras e os pNETs. Com certeza essa translocação será de grande valor no diagnóstico para distinguir o sarcoma de células claras do melanoma maligno.

### **V - Lipossarcoma**

O lipossarcoma mixóide tem uma translocação característica entre cromossomas 12 e 16: t(12;16)(q13;q11) (1,69,20,64). Essa translocação chama atenção pela consistência de sua presença no lipossarcoma mixóide e sua especificidade para tumores deste tipo. A translocação envolve o gene *CHOP*, no cromossoma 12 e *TLS/FUS* no cromossoma 16 (12,53). O *TLS/FUS* é um gene relacionado com *EWS* e também tem atividade de ligar *RNA*. Além disso, o *CHOP* é membro de uma família de genes que codificam fatores de transcrição e a proteína de fusão; assim, tem capacidade oncogênica por causa de ativação gênica alterada. Um outro ponto de interesse é que o *TLS/FUS* também está envolvido na translocação t(16;21)(p11,q22) em leucemia mielóide (30,60). Nesta forma de leucemia a translocação é com *ERG*, um dos genes envolvidos na translocação t(21;22)(q22;q11) em sarcoma de Ewing.

### **VI - Sarcoma sinovial**

O sarcoma sinovial é também caracterizado por uma translocação t(X;18)(p11;q11) em quase 100% dos casos (40). Até agora os genes envolvidos não são ainda conhecidos, mas a especificidade e frequência da translocação prometem um papel de alta importância no diagnóstico futuro desse sarcoma.

### **Aplicação clínica de análise genética dos sarcomas de partes moles**

A frequência das translocações a sua especificidade para determinado tipo de sarcoma torna sua detecção fundamental no diagnóstico e evolução do tumor. Existem várias instâncias onde a classificação de um tumor não é simples e a detecção de uma translocação, ou no caso de eRMS um LOH, pode ser de grande importância. É provável que, na luz da complexidade da classificação dos sarcomas de partes moles, o sarcoma será definido, no futuro próximo, por suas características genéticas e não por sua morfologia. Assim, a biologia molecular mudará para sempre a base diagnóstica desse importante e complexo grupo de tumores.

A detecção de translocações pode ser feita em menos de um dia após a biópsia. Duas metodologias são disponíveis: visualização da translocação em células durante a interfase, usando sondas fluorescentes (em inglês, fluorescent *in situ* hybridization ou FISH), ou amplificação do gene híbrido pela reação em cadeia da polimerase (em inglês, polymerase chain reaction ou PCR). Ambas as técnicas têm uma baixa probabi-

lidade de falsos-negativos (<10%) mas, entre elas, provavelmente a PCR é de maior valor à clínica. A PCR é uma reação enzimática que envolve uma DNA polimerase termoestável e iniciadores altamente específicos para a sequência de interesse. A PCR tem a capacidade de amplificar sequências específicas do material genético e pode ser usada para determinar a presença ou ausência de um gene com a da sequência de interesse. No caso da detecção de translocações, o RNA mensageiro será detectado pela PCR usando, como a primeira etapa, a conversão do mRNA para DNA, por transcrição reversa. Assim, o teste se chama RT-PCR. A reação é cíclica, controlada por alterações em temperatura, e tem a capacidade de produzir até um bilhão de cópias da sequência-alvo. A PCR é a base de essencialmente todas as aplicações clínicas da biologia molecular, além de ser a ferramenta básica em pesquisas para alterações genéticas associadas ao câncer. Existem inúmeros textos básicos que podem fornecer maiores detalhes e esclarecimentos dessa importante metodologia (54,72).

É claro que a PCR tem um papel importante no diagnóstico inicial de um sarcoma pela detecção de alterações genéticas associadas com cada tipo de tumor. Além disso, a PCR tem aplicação no prognóstico da doença e avaliação do tratamento. A base dessas aplicações é a especificidade da translocação para as células tumorais, que torna-se um marcador para a presença dessas células. Assim, a PCR pode ser feita com RNA extraído de tecidos distantes do tumor, como um teste altamente sensível para metástases. Assim, em pacientes onde o tumor primário já foi demonstrado positivo para uma translocação, a PCR pode ser repetida com amostras de medula óssea, por exemplo, para avaliar o envolvimento deste tecido. Pacientes com metástases na medula óssea têm um prognóstico pior do que aqueles sem tais metástases, já possibilitando consideração de tratamentos mais agressivos. Do mesmo modo, a reavaliação da medula óssea em pacientes positivos para metástases no início do tratamento serve como um marcador da resposta à terapia. Já foi publicado um estudo inicial procurando a presença de células com a translocação t(11;22) por RT-PCR na medula óssea e sangue periférico em casos de sarcoma da família Ewing (51). Em seis de 16 casos a medula óssea foi positiva para presença da translocação e em mais um o sangue periférico foi positivo. Em dois de quatro casos, amostras positivas foram detectadas durante terapia. É necessária a continuação desse trabalho para se avaliar o significado dos achados em termos prognósticos.

Além do uso em diagnóstico e prognóstico dos sarcomas, a especificidade das translocações abre outras perspectivas futuras de terapia gênica. Até agora nenhuma terapia desse tipo está disponível para aplicação clínica, mas na área de câncer uma das maiores possibilidades é o tratamento de tu-

mores com translocações, por causa da total especificidade da alteração para as células tumorais. A idéia básica da terapia gênica é que pode-se induzir alterações no genoma das células, alterando seu fenótipo. Por exemplo, em casos de deficiências metabólicas hereditárias, o gene ausente ou mutado pode ser introduzido para corrigir a deficiência. No caso de câncer, a situação é mais complicada mas envolveria mudanças nas células tumorais, que iriam formar as células suscetíveis ao tratamento ou reverter diretamente o fenótipo maligno. E experimentos *in vitro* têm demonstrado uma possível abordagem genética para alteração do fenótipo de células de sarcoma de Ewing com as translocações t(11;22) e t(21;22)49. Esses pesquisadores conseguiram introduzir, dentro das células, genes artificiais que produzem mRNAs complementares ("anti-sense"), àqueles produzidos pelos genes híbridos resultantes das fusões. Os mRNAs complementares tiveram a capacidade de interagir com os mRNAs das translocações e inibir sua tradução, reduzindo os níveis das proteínas híbridas. As células com níveis reduzidos das proteínas híbridas mostraram perda de malignidade, em testes *in vitro*, e também quando usadas para tentar induzir tumores em camundongos atômicos. Esse experimento mostrou, assim, que a expressão alta da proteína híbrida é essencial para malignidade, que é possível reduzir sua expressão por manipulação gênica e que esta manipulação efetivamente reverteu o fenótipo das células. O grande desafio atual na área da terapia gênica envolve, principalmente, o desenvolvimento de métodos para introduzir genes *in vivo*, numa maneira especí-

fica e estável, para reproduzir os efeitos mostrados *in vitro* e assim tratar tumores.

### Conclusões

Estudos de genética molecular contribuíram para os grandes avanços conquistados nos últimos anos em nosso conhecimento da biologia de sarcomas, principalmente pela definição das translocações cromossômicas características de vários destes tumores. A definição das translocações e o desenvolvimento de metodologias sensíveis e rápidas para sua detecção abriram perspectivas para o diagnóstico de sarcomas de partes moles baseado na detecção destas alterações genéticas. Existem, também, possibilidades de prognóstico e estadiamento molecular baseados na detecção de metástases. Os princípios já são claros e falta análise de números maiores de tumores e padronização dos detalhes das técnicas para se começar a colocar estas possibilidades na rotina clínica. Assim, o futuro próximo pode ser visto como a época do diagnóstico molecular, que vai ajudar a otimizar o uso de terapias atuais para o tratamento de sarcomas. Esperamos uma época subsequente, na qual os avanços da genética molecular fornecerão novas opções para o tratamento destes tumores pelas técnicas de terapia gênica ou pelo desenvolvimento de novas terapias baseadas nas características bioquímicas das proteínas híbridas presentes nos sarcomas. A consistência das alterações genéticas nesta forma de câncer humano e a dependência de malignidade numa mutação só, os sarcomas representam um dos alvos mais prováveis no desenvolvimento de terapia gênica para o controle de câncer.

### Summary

*Sarcomas, like other human tumors, are caused by mutations in oncogenes and tumor suppressor genes. Among these some, such as p53, are frequently mutated both in sarcomas as well as other human tumors. On the other hand, there are a number of mutations which are highly specific for particular sarcomas and which may serve as important diagnostic markers. Examples of mutations with diagnostic potential include the translocation between PAX3 and FKHR in alveolar rhabdomyosarcomas, the translocation between EWS and FLI-1 in primitive neuroectodermal tumors and the translocation between EWS and ATF-1 in clear cell sarcomas. Each of these translocations can be detected by molecular methodologies which may constitute an important part of the future diagnostic repertoire.*

### Referências bibliográficas

- 1 - Aman P, Ron D, Mandahl N, et al. Rearrangement of the transcription factor gene CHOP in myxoid liposarcomas with t(12;16)(q13;p11). *Genes Chrom Cancer* 1992; 5:278-5.
- 2 - Andreassen, A. ( yjord T, Hovig E, et al. p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas. *Cancer Res* 1993;53:468-71.
- 3 - Aurias A, Rimbaut C, Buffe D, et al. Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma. *N Engl J Med* 1993;309:496-7.
- 4 - Barr FG, Galili N, Holick J, et al. Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nature Genet* 1993;3:113-7.
- 5 - Becroft DMO, Pearson A, Shaw RL, et al. Chromosome translocation in extraskeletal Ewing's tumour. [letter]. *Lancet* 1994;II:400.
- 6 - Ben-David Y, Giddens EB, Letwin K, et al. A erythroleukemia induction by Friend murine leukemia virus: insertional activation of a new member of the ets gene family, Fli-1., closely linked to c-ets-1. *Genes Dev* 1991;5:908-18.
- 7 - Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 1994;54:1298-304.
- 8 - Braun T, Winter B, Bober E, et al. Transcriptional activation domain of the muscle-specific gene-regulatory protein myf5. *Nature* 1990;346:663-5.
- 9 - Carson DA, Lois A. Cancer progression and p53. *Lancet* 1995;346:1009-11.
- 10 - Cavazzana AO, Miser JS, Jefferson J, et al. Experimental evidence for a neural origin of Ewing's sarcoma of bone. *Am J Pathol* 1987;127:507-18.
- 11 - Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnjak M, et al. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1994;54:794-9.

- 12 - Crozat A, Aman P, Mandahl N, et al. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* 1993; 363:640-8.
- 13 - Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, et al. Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13) (p36;p14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 1994;54:2869-72.
- 14 - de Chadarevian JP, Vekemans M, Seemayer TA. Reciprocal translocation in small-cell sarcomas. *N Engl J Med* 1984;311:1701-3.
- 15 - Del Cin P, Brock P, Aly MS, et al. A variant 2:13 translocation in rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;54:191-5.
- 16 - Delatre O, Zucman J, Plougastel B, et al. Gene fusion with an ETS DNA binding domain caused by chromosome translocation in human cancers. *Nature* 1992;359:162-5.
- 17 - Dias P, Kumar P, Marsden HB, et al. N-myc gene amplified in alveolar rhabdomyosarcomas (RMS) but not in embryonal RMS. *Int. J Cancer* 1990;45:593-6.
- 18 - Dias P, Parham DM, Shapiro DN, et al. Myogenic regulatory protein (MyoD1) expression in childhood solid tumors: diagnostic utility in rhabdomyosarcoma. *Am J Pathol* 1990;137:1283-91.
- 19 - Downing JR, Head DR, Parham DM, et al. Detection of the (11;22)(q24;q12) translocation of Ewing/Es sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1993;143:1294-300.
- 20 - Eneroth M, Mandahl N, Heim S, et al. Localisation of the chromosomal breakpoints of the (12;16) in liposarcoma to subbands 12q13.3 and 16p11.2. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;48:101-7.
- 21 - Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61: 759-67.
- 22 - Felix CA, Kappel CC, Mitsudomi T, et al. Frequency and diversity of p53 mutations in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 1992;52:2243-7.
- 23 - Galili N, Davis RJ, Fredereks WJ, et al. Fusion of a head domain gene to PAX3 in the solid tumor alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* 1993;5:230-5.
- 24 - Gerald WL, Miller HK, Battifora H, et al. Intra-abdominal desmoplastic small round-cell tumor. Report of 19 cases of a distinctive type of high-grade polyphenotypic malignancy affecting young individuals. *Am J Surg Pathol* 1991;15:499-513.
- 25 - Giovannini M, Biegel JA, Serra M, et al. EWS-Erg and EWS-Flt-1 fusion transcripts in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors with variant translocations. *J Clin Invest* 1994;94:489-96.
- 26 - Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, et al. 1994. Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878.
- 27 - Hosoi, H, Sugimoto, T, Hayashi, Y, et al. 1992. Differential expression of myogenic regulatory genes, MyoD1 and myogenin, in human rhabdomyosarcoma sublines. *Int. J. Cancer* 50: 977-983.
- 28 - Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, et al. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* 25: 49-53.
- 29 - Ida, K, Kobayashi, S, Taki, T et al. 1995. EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric mRNAs in Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor. *Int. J. Cancer* 63: 500-504.
- 30 - Ichikawa, H, Shimizu, Y, Hayashi, Y, et al. 1994. An RNA-binding protein gene, TLS/FUS, is fused to ERG in human myeloid leukemia with, t(16;21) chromosomal translocation. *Cancer Res.* 54: 2865-2868.
- 31 - Klemsz, MJ, Maki, RA, Papyannopoulou, T, et al. 1993. Characterization of the ets oncogene family member, flt-1. *J. Biol. Chem.* 268: 5769-5773.
- 32 - Koi, M, Johnson, LA, Kalikin, LM, et al. 1993. Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11. *Science* 260: 361-367.
- 33 - Komuro, H, Hayashi, Y, Kawamura, M, et al. 1993. Mutations of the p53 gene are involved in ewing/Es sarcomas but not in neuroblastomas. *Cancer Res.* 54, 2837-2840.
- 34 - Koufos, A, Hansen, MF, Copeland, NG, et al. 1985. Loss of heterozygosity in three embryonal tumors suggests a common pathogenetic mechanism. *Nature* 316: 330-334.
- 35 - Kovar, H, Auinger, A, Jug, G, et al. 1993. Narrow spectrum of infrequent p53 mutations and absence of MDM2 amplification in ewing tumours. *Oncogene* 8: 2683-2690.
- 36 - Ladanyi, M, & Gerald, W, 1994. Fusion of the EWS and WT1 genes in the desmoplastic small round cell tumor. *Cancer Res.* 54: 2837-2840.
- 37 - Leach, FS, Tokino, T, Meltzer, P, et al. 1993. p53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res.* 53: 2231-2234.
- 38 - Levine, AJ, Momand, J, Finlay, CA 1991 The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-56.
- 39 - Li, FP, Fraumeni, JF 1969. Soft tissue, breast cancer and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann. Intern. Med.* 71: 747-752.
- 40 - Limon, J, Mrozek, K, Mandahl, N, et al. F. 1991. Cytogenetics of synovial sarcoma: presentation of ten new cases and review of the literature. *Genes Chrom. Cancer* 3: 338-345.
- 41 - Lipinski, M, Braham, K, Philip, I, et al. T. 1987. Neuroectoderm-associated antigens on Ewing's sarcoma lines. *Cancer Res.* 47: 183-187.
- 42 - Loh, WE, Scrabble HJ, Livamos, E, Arhoda, MJ, Cavenee, WK, Mitsuo, O et al. BE 1992. Human Chromosome 11 contains two different growth suppressor genes for embryonal rhabdomyosarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1755-1759.
- 43 - May, WA, Gishizky, M, Lessnick, SL, et al. 1993. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5752-5756.
- 44 - May, WA, Lessnick, SL, Braun, BS, et al. C.T. 1993. The ewing/Es sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol. Cell Biol.* 13: 7393-7398.
- 45 - McKeon C, Thiele, CJ, Ross, RA, et al. 1988. Indistinguishable patterns of protooncogene expression in two distinct but closely related tumors: Ewing's sarcoma and neuroepithelioma. *Cancer Res.* 48: 4307-4311.
- 46 - Momand, J, Zambetti, GP, Olson, DC, et al. 1992. The MDM2 oncogene product forms a complex with p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245.
- 47 - Mulligan, LM, Matlashewski, GJ, Scrabble, HJ et al. 1990. Mechanisms of p53 loss in human sarcomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 5863-5867.
- 48 - Oliner, JD, Kinzler, KW, Meltzer, PS, et al. 1992. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80-83. *Journal of Clinical Oncology* 13: 2123-2139.
- 49 - Ouchida, M, Ohno, T, Fujimura, Y, et al. 1995. Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 11: 1049-1054.
- 50 - Perez-Ataíde, AR, Grier, H, Weinstein, H, et al. 1985. Neuroectodermal differentiation in bone tumors presenting as Ewing's sarcoma. In: SIOP, XVIII meeting. Venice, Italy.
- 51 - Pfeleiderer, C, Zoubek, A, Gruber, B, et al. 1995. Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from ewing tumour patients by RT-PCR. *Int. J. Cancer* 64: 135-139.
- 52 - Prasad, DDK, Rao, VN et al. 1992. Structure and expression of human Flt-1 gene. *Cancer Res.*, 52: 5833-5837.
- 53 - Rabbits, TH, Forster, A, Larson, R et al. 1993. Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nature Genet.* 4: 175-180.
- 54 - Raskó, I, Downes CS 1995. Genes in Medicine - Molecular Biology and human genetic disorders. Chapman & Hall, London.
- 55 - Reissmann PT, Simom, MA, Lee, WH et al. 1989. Studies of the retinoblastoma gene in human sarcomas. *Oncogene* 4: 839-843.
- 56 - Scrabble, H, Witte, DP, Lampkin, BC et al. 1987. Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. *Nature* 329: 645-647.
- 57 - Scrabble, H, Witte D, Shimada H, et al. 1989. Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1: 23-25.
- 58 - Seidal, T, Mark, J, Hagman, B et al. 1982. Alveolar rhabdomyosarcoma: a cytogenetic and correlated cytological and histological study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand, C. Immunol.* 90: 345-354.
- 59 - Shapiro, DN, Sublett, JE, Li, B et al. 1993. Fusion of PAX3 to a member of the fork head family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 53: 5108-5112.
- 60 - Shimizu, k, Ichikawa, H, Tojo, A, et al. M 1993. An ets-related gene, is rearranged in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal

- translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10.280-10.284.
- 61 - Smith, SH, Weiss, SW, Jankowski, SA, et al. 1992. SAS amplification in soft tissue sarcomas. Cancer Res. 52: 3746-3749.
  - 62 - Sorensen, PHB, Lessnick, SL, Lopez-Terrada, D, et al. 1994. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. Nature Genet. 6: 146-151.
  - 63 - Sorensen, PHB, Shimada, H, Liu, XF, et al. 1995. Biphenotypic Sarcomas with Myogenic and Neural Differentiation express the Ewing's Sarcoma EWS/FLI1 fusion gene. Cancer Res. 55: 1385-1392.
  - 64 - Sreekantaiah, C, Leong, SPL, Karakousi, CP, et al. 1991. Cytogenetic profile of 109 lipomas. Cancer Res. 51: 422-433.
  - 65 - Stratton, MR, Fisher, C, Gusterson, BA, et al. 1989. Detection of point mutations in N-ras genes of human embryonal rhabdomyosarcomas using oligonucleotide probes and the polymerase chain reaction. Cancer Res. 49: 6324-6327.
  - 66 - Sublett, JE, Jeon, I, Shapiro, DN, 1995. The alveolar rhabdomyosarcoma PAX3/FKHR fusion protein is a transcriptional activator. Oncogene 11: 545-552.
  - 67 - Toguchida, J, Yamaguchi, T, Ritchie, B, et al. 1992. Mutation spectrum of the p. 53 gene in bone and soft tissue sarcomas. Cancer Res. 52: 6194-6199.
  - 68 - Turc-Carel, C, Aurias, A, Mugneret, F, et al. 1988. Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases of remarkable consistency of t (11;22)(q24;q12). Cancer Genet. Cytogenet. 32: 229-238.
  - 69 - Turc-Carel, C, Limon, J, Dal-Cuin, P, et al. 1986. Cytogenetic studies of adipose tissue tumors. II Cancer Genet Cytogenetic 23: 291-299.
  - 70 - Turc-Carel, C, Lizard-Nacol, S, Justrabo, E, et al. 1986. Consistent Chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. Cancer Genet. Cytogenet. 19: 361-362.
  - 71 - Turc-Carel, C, Philip, I, Berger, MP, et al. 1983. Chromosomal translocation in Ewing/Es sarcoma. N. Engl. J. Med. 309: 497-498.
  - 72 - Watson, JD, Gilman, M, Witkowski, J, Zoller, M, 1992 Recombinant DNA. Scientific American Books, New York.
  - 73 - Whang-Peng, J, Triche, TJ, Knutsen, T, et al. 1984. Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma. N. Engl. J. Med. 31: 584-585.
  - 74 - Whang-Peng, J, Knutsen, T, Thiel, K, et al. 1992. Cytogenetic studies in subgroups of rhabdomyosarcoma. Genes, Chromosomes Cancer, 5: 299-310.
  - 75 - Wright, WE, Sassoon, DA & Lin, VK, 1989. Myogen, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. Cell, 56: 607-617.
  - 76 - Zucman, J, Delattre, O, Desmaze, C, et al. 1993 EWS and AFT-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts. Nat. Genet. 4: 341-345.
  - 77 - Zucman, J, Melot, T, Desmaze, C, et al. 1993. Combinational generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. EMBO J. 12: 4481-4487.