

**IMPACTO PROGNÓSTICO DE
ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM
TUMORES DE EWING/PNET**

FERNANDA ROCHA ROJAS AYALA

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto
Soares**

**Co-Orientadora: Dra. Isabela Werneck da
Cunha**

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Ayala, Fernanda Rocha Rojas

Impacto prognóstico de aberrações cromossômicas em tumores de Ewing/PNET / Fernanda Rocha Rojas Ayala, 2011.

128p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares.

Descritores: 1. PROGNÓSTICO 2. ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS
3. SARCOMA DE EWING 4. NEOPLASIAS ÓSSEAS. 5. FISH.

"Depois que cansei de procurar aprendi a encontrar.
Depois que um vento me opôs resistência,
velejo com todos os ventos."

Friedrich Nietzsche

DEDICATÓRIA

Aos meus orientadores, **Dr. Fernando Soares e Dra. Isabela Werneck**, pessoas que eu admiro e que eu tive a sorte de tê-los em meu caminho. Agradeço pela oportunidade de realizar este estudo, por terem acreditado na minha capacidade de finalizá-lo, por terem contribuído, juntamente, para o meu crescimento profissional e pessoal, sempre com Apoio, Força, Incentivo e Companheirismo. Sem vocês o meu aprendizado seria incompleto. Sinto-me como uma pedra bruta, agora um pouco mais polida. Palavras sempre serão insuficientes para expressar os meus sentimentos de afeição e gratidão por vocês. Os seus exemplos de ética profissional sempre me acompanharão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus pais, **Marciano Ayala e Gal Rojas** pela dedicação em me educar, sempre me dando o melhor exemplo de vida possível, mostrando-me o bem que vem do coração. Nunca tirando os percalços que existiram no caminho, mas sim, ensinando-me a desviá-los ou me dando apoio quando isso não era possível. Hoje, com os meus valores concretizados, - a humildade, a compreensão, a ética, a busca pelo conhecimento e o respeito por tudo que faço, percebo que seus esforços foram válidos e sempre serei, a vocês, grata e fiel. Obrigada por depositarem em mim muito amor e ternura, e por sempre terem tornado os meus anseios e sonhos reais, exceto quando eram devaneios, mesmo assim, obrigada, pois hoje eu reconheço e agradeço. Obrigada, pais, sobretudo pela minha educação e pelo meu conhecimento até aqui adquirido, como vocês sempre dizem: “eles são a minha maior herança”. Agradeço, também, pelo incentivo dado para que eu pudesse superar todas as dificuldades, e por me ensinarem a ter coragem, e mesmo com medo, seguisse os meus deveres com determinação e esperança.

Agradeço à minha irmã, **Mariana Ayala**, por sempre torcer pelo meu sucesso e por sempre me lembrar, pelas suas atitudes serenas e exatas que, a vida pode ser leve e calma. Amo você.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador no exterior, **Dr. Jeremy Squire**, por ter confiado na minha capacidade de realizar este trabalho, abrindo as portas do seu laboratório no Canadá, com isso, fazendo com que eu me sentisse em casa. Obrigada pelo aprendizado dado, pela disposição, pelo incentivo e pela paciência em me fazer entender novos conceitos e, também, pela vontade e pelo prazer em me ensinar a fazer pesquisa, para que este projeto progredisse da melhor maneira possível. Você me ensinou a ser mais curiosa a ponto de amar a ciência, querendo através dela ajudar os outros, e, principalmente, a importância de compartilhar tarefas, respeitando o conhecimento alheio. Obrigada por me proporcionar tamanha felicidade e enriquecimento científico. ***Thank You so much.***

A todos os alunos, pesquisadores e técnicos do Laboratório de Citogenética Molecular– Queen’s University, pelos 18 meses de um bom convívio e por terem proporcionado tantos momentos de aprendizado da genética do câncer, mas sobretudo cooperarem para o meu crescimento pessoal. Um “obrigada” especial a Julia Williams, Jeff Martin e Crystal D’Silva, pela ajuda sempre presente, pela simpatia, pelo carinho e amizade. Outro “obrigada”, mais que especial aos doutores **Georges Maire, Maisa Yashimoto e Madhuri Koti** por me fazerem entender a genética e suas técnicas com tranquilidade e precisão, pela paciência em me falar das suas experiências, sempre me orientando com muito carinho. Os momentos dentro e fora do laboratório sempre foram alegres e valiosos na companhia de vocês. Vocês são inesquecíveis.

Um super obrigada, aos meus amigos canadenses, **Felipa Moore e Alex Moore, John Casning e Krista Casning** por toda hospitalidade, presteza e carinho desde o início da minha chegada.

Agradeço aos meus amigos, **Rejane Schirr, Bianca Curvelo, Nadia Castro, Mariana Curado, Margareth Ozelo, Marina Werneck e César Macedo**, pela amizade sincera, pelo carinho, pela força, pela torcida e por sempre minimizarem os instantes de tristezas, com muita leveza e otimismo, e por tornarem os momentos de felicidades, intensos. Sem vocês a minha vida seria muito menos prazerosa.

Às amigas que ganhei nesses seis anos de laboratório, Yukie, Edaise, Ligia, Alice, Marcilei, Cláudia e Kátia, pelo apoio durante o desenrolar deste projeto. Obrigada pelas discussões, críticas, elogios, soluções, risadas e momentos tão alegres vividos juntas.

A todos os alunos, pesquisadores, médicos, residentes e técnicos do Depto. de Anatomia Patológica – Hospital A.C. Camargo, Gilmara, Liliane, Marina, Rodrigo, Ivan, Fátima, Simone, Carlinhos e Severino, pelo tempo de convívio. E a Louise De Brot, obrigada pela companhia e pelos momentos de descontração.

Agradeço a todos os alunos, pesquisadores e funcionários do CIPE – Hospital A.C. Camargo, pelo ambiente de amizade e por tantas discussões produtivas que contribuíram para esse projeto e para outros tantos.

Agradeço à diretora da pós-graduação, Ana Maria Kuninari, e às secretarias, Luciana Pitombeiras e Vanuza Barros Rodrigues, da Pós-graduação do Hospital A.C. Camargo pela simpatia, suporte, competência e apoio ao longo desses 4 anos.

À equipe da biblioteca, Suely Francisco, Ana Paula Teixeira Santos e Jefferson de Oliveira, por catalogar a minha tese, pelas centenas de artigos pesquisados, pela atenção e dedicação nos momentos requeridos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, presidente da Fundação Antonio Prudente, pela excelentes condições de trabalho.

Ao membro da banca de qualificação, Dr. Victor Piana de Andrade, pelas correções, sugestões e críticas construtivas durante o andamento desse estudo.

Ao médico, **Roberto Falzoni** pelas precisas análises da técnica de imunistoquímica realizadas no início deste trabalho. Muito obrigada.

Aos membros da banca examinadora desta tese, por aceitarem o convite e pela disposição em ler e arguir este trabalho.

À FAPESP, pelo suporte financeiro para que esse estudo pudesse ser realizado e pela bolsa de estudos concedida.

À CAPES, pelo compromisso com a bolsa de estudos concedida no exterior sendo sempre pontual e eficaz nas trocas de informações.

RESUMO

Ayala FRR. **Impacto prognóstico de aberrações cromossômicas em tumores de Ewing/PNET**. São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: A fusão *EWS-ETS* é um evento genético envolvido na patogênese dos tumores de Ewing (TE); entretanto, a progressão dessa doença é devido à adição de outras alterações genéticas. **Objetivo:** Analisar o impacto prognóstico de regiões genéticas específicas em um série de pacientes com TE. **Material e Métodos:** Através de análises *in silico* usando o banco de dados Progenetix, os cromossomos 7, 8 e 12 e as regiões 1q e 16q foram identificadas como alterações genéticas mais recorrentes na progressão de TE, mas sem consistência quanto ao prognóstico. Lâminas de TMA, incluindo 132 pacientes com TE do Hospital A.C. Camargo, foram construídas para análises de alterações no número de cópias gênicas (ANC) dos cromossomos 7, 8 12 e regiões 1q32.1 (*KIF14/MDM4/PIK3C2B/DDX59*) e 16q21 (*CDH11*), por hibridação por fluorescência *in situ* em núcleos interfásicos (*iFISH*). Essas análises foram feitas através da construção de sondas caseiras (BAC) (laboratório de citogenética molecular, Canadá) para as regiões 1q32.1 e 16q21 e através de sondas comerciais de centrômeros 7, 8 e 12. Ao final, a frequência de ANC foram correlacionadas com as características clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes. **Resultados:** Análises de ANC mostraram ganhos em 1q32.1 em 15/121 (12.4%) pacientes. Anormalidades em 16q21 foram vistas em 24/115 (20.9%) pacientes: um grupo com 11/115 (9.6%) pacientes apresentaram deleções por hemizigose, e o outro, 13/115 (11.3%) pacientes apresentaram ganhos em 16q21. Aneussomias dos cromossomos 7, 8 e 12 foram vistas em 9.7%, 21.8% e 14.5%, respectivamente. Análises univariadas mostraram associação entre ganhos de 16q21 ($p=0.029$) ou 1q32.1 ($p=0.005$) e recorrência da doença em pacientes portadores de TE com doença

localizada. As curvas de sobrevida global mostraram ganhos em 16q21 como prognóstico desfavorável ($p=0.04$) para doença localizada. Curvas de sobrevida livre de doença apresentaram ganhos em, 1q32.1 ($p=0.014$) e em 16q21 ($p=0.002$), como parâmetros genéticos para risco de recorrência em pacientes com TE localizados. O grupo de pacientes da população geral que apresentaram ganhos do cromossomo 8, apresentaram bom prognóstico ($p=0.04$). Além disso, pacientes que mostraram ganhos da região 16q21, concomitantemente, com ganhos do cromossomo 7, 8 e/ou 12 tiveram as piores taxas de sobrevida livre de doença que outras interações ($p=0.006$), mas somente a associação com o ganhos do cromossomo 12 apresentaram associação estatística na população total ($p<0.0001$) e na localizada ($p=0.003$). Análises multivariadas confirmaram 1q32.1, 16q21 e alterações de 16q21 com as aberrações do cromossomo 12, como fatores prognósticos independentes de recorrência para doença localizada. **Conclusão:** Ganhos de cópias gênicas em 1q32.1 e 16q21 constituem relevantes marcadores de recorrência em TE localizados. Trissomia do cromossomo 12 é indicativo de doença avançada somente associada a ganho da região 16q21. As alterações genéticas nessas regiões podem alterar funções de importantes genes em distintas vias moleculares, e, assim, desencadear mecanismos moleculares complexos que levarão ao crescimento e agressividade tumoral em pacientes portadores de TE.

SUMMARY

Ayala FRR. **[Prognostic impact of chromosomal aberration in Ewing/PNET tumors]**. São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Background: *EWS-ETS* genetic fusion appears to be the initiating mechanism behind Ewing Family of Tumors (EFT) pathogenesis; however, progression of the disease is dependent on additional genetic alterations.

Objective: To analyse specific genetic alterations on a large serie of EFT.

Material and Methods: Using the Progenetix database, we identified mainly genomic alteration of chromosome 7, 8 12 and 1q, and at 16q, as the most recurrent genetic alterations linked to EFT progression without consistency as markers of relapse in EFT. Clinic features of a large genotype cohort of 132 patients with EFT were retrospectively reviewed from A.C. Camargo Hospital records. Tissue microarrays (TMA) were built for interphase fluorescent *in situ* hybridization (iFISH) analysis of chromosomes 7, 8 12 (commercial probes) and regions of 1q32.1 (*KIF14/MDM4/PIK3C2B/DDX59*) and 16q21 (*CDH11*), these last using BAC probes (Molecular Cytogenetic laboratory, Canada). The frequencies of gene copy number alterations (CNA) were compared with patient's clinical parameters and follow-ups. **Results:** CNA analysis showed gains at 1q32.1 in 15/121 (12.4%) patients. Abnormalities at 16q21 were seen in 24/115 (20.9%) patients: a group with 11/115 (9.6%) patients presented hemizygous deletion, and another, 13/115 (11.3%) patients showed gains at 16q21. Aneusomies at chromosome 7, 8 and 12 were seen in 9.7%, 21.8% and 14.5%, respectively. A significant association between 1q32.1 gains and 16q21 losses ($p=0.029$) was detected, but not a significant clinical synergism. Gains at 16q21 were associated with tumor relapse in the localized disease population ($p=0.029$). Gains at 1q32.1 or at 16q21 were associated with an unfavorable outcome, and were confirmed as independent prognostic relapse markers ($p=0.014$; $p=0.002$) for

localized disease. Also, extra copies of chromosome 8 defined patients with good prognosis ($p=0.04$). Moreover, patients that showed gains at 16q21, with extra copies of 7, 8 and/or 12 presented poor rates for disease free survival ($p=0.006$). However, only 16q21 gains were associated with trisomy 12 ($p<0.0001$) in total population and localized disease ($p=0.003$), its interaction constituted an independent prognostic risk of relapse value.

Conclusions: CNA of 1q32.1 and 16q21 constitute valuable indicators of relapse in localized EFT. Trisomy 12 is indicative of advanced disease only associated with 16q21 gains. Genomic alterations of the critical genes in these chromosomal regions, probably activate key downstream target genes of distinct pathways, which then lead to an intricate molecular mechanism for tumor growth and aggressiveness.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotomicrografia da morfologia de tumores de Ewing sarcoma	2
Figura 2	Modelo esquemático de eventos genéticos em tumores do grupo de TE que levam à doença avançada.....	13
Figura 3	Exemplar de lâmina utilizada para análise em corte convencional dos 24 casos não incluídos no TMA.....	19
Figura 4	(a) Esquema mostrando montagem do bloco de TMA e lâmina para análise e (b) Exemplar de lâmina de TMA utilizada para as análises de FISH.....	22
Figura 5	Ideogramas de representação cromossômica dos resultados de análises <i>in silico</i> obtidos pelo programa Nexus.....	24
Figura 6	Reações de mFISH e iFISH para validação da alteração genética do gene <i>EWS</i>	32
Figura 7	Validação da região locus-específico, 1q21 e 1q32.1, das sondas caseiras de BAC por metáfase FISH.....	33
Figura 8	Validação da região locus-específico das sondas caseiras de BAC por metáfase FISH da região 16q21.....	34
Figura 9	Representação esquemática da estratégia das reações de iFISH realizadas neste estudo.....	36
Figura 10	Reação de iFISH para análise de quebra do gene <i>EWS</i> e fusão <i>EWSR1-FLI1</i> em células de tumores de Ewing.....	54
Figura 11	Análises de multicolor iFISH em tecidos de TE para a região 1q32.1	59

Figura 12	Imagens representativas de iFISH mostrando as alterações genéticas da região 16q21 em tumores de Ewing.....	65
Figura 13	Venn diagrama mostrando a distribuição e a interrelação das alterações genéticas das regiões 1q21-1q32.1 e 16q21 em 46 tumores de Ewing.....	66
Figure 14	Imagens representativas de iFISH mostrando as alterações no número de cópias dos cromossomos 7, 8 e 12 pela técnica de iFISH em tumores de Ewing.....	72
Figura 15	Identificação da interação entre as alterações do número de cópias de genes e dos cromossomos em um caso (2.I do TMA) de tumores de Ewing por multicolor iFISH.....	77
Figura 16	Curva de sobrevida global.....	79
Figura 17	Curva de Kaplan – Meier e teste de Log-Rank mostrando a estimativa de sobrevida global para idade.....	80
Figura 18	Curva de Kaplan – Meier e teste de Log-Rank mostrando a estimativa de sobrevida global em relação a fusão <i>EWS-FLI1</i>	81
Figura 19	Curva de Sobrevida livre de doença.....	82
Figura 20	Curva de sobrevida livre de doença para as regiões: 1q32.1 e 16q21 em pacientes com tumores de Ewing.....	83
Figura 21	Curva de sobrevida global para os cromossomos 7, 8 ou 12.....	85
Figura 22	Curva de sobrevida livre de doença dos cromossomos 7, 8 e 12 com simultâneos ganhos da região 16q21 em pacientes com tumores de Ewing.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos clones de BAC e sondas comerciais utilizados neste estudo.....	35
Tabela 2	Características clínico-patológicas dos 132 pacientes com tumores de Ewing do estudo.....	50
Tabela 3	Representação das dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de ganho de cópias gênicas.....	56
Tabela 3.1	Cálculo matemático para limites de ganho dos genes da região 1q32.1.....	56
Tabela 4	Frequência de amostras com alterações no número de cópias gênicas em 1q32.1, em 128 pacientes avaliáveis.....	58
Tabela 5	Representação de dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de ganho de cópias gênicas.....	61
Tabela 5.1	Cálculo matemático para limites de ganho dos genes da região 16q21-q22.....	62
Tabela 6	Representação de dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de deleção por hemizigose.....	62
Tabela 6.1	Cálculo matemático para limites de deleção/hemizigose dos genes da região 16q21-q22.1.....	64
Tabela 7	Frequência de amostras com alterações no número de cópias gênicas na região 16q21-16q22.1 em 115 casos analisados.....	64

Tabela 8	Representação de dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de ganho do cromossomo 7.....	67
Tabela 8.1	Cálculo matemático para limites de ganho extra do cromossomo 7.....	68
Tabela 9	Representação de dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de ganho do cromossomo 8.....	68
Tabela 9.1	Cálculo matemático para limites de ganho extra do cromossomo 8.....	68
Tabela 10	Representação dos dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de ganho do cromossomo 12.....	69
Tabela 10.1	Cálculo matemático para limites de ganho extra do cromossomo 12.....	69
Tabela 11	Alterações genéticas dos casos pareados (tumor primário vs recaída tumoral).....	71
Tabela 12	Frequência de amostras com alterações no número de cópias dos cromossomos 7, 8 e 12, em 124 pacientes avaliáveis.....	71
Tabela 13	Associação entre o região do gene <i>CDH11</i> em relação a região 1q32.1 em 114 casos avaliáveis.....	74
Tabela 13.1	Associação entre o região do gene <i>CDH11</i> em relação a região 1q32.1 em 83 casos avaliáveis de pacientes com doença localizada.....	74
Tabela 13.2	Associação entre o região 16q em relação a região 1q21-1q32 em 114 casos avaliáveis.....	74

Tabela 13.3	Associação entre o região 16q em relação a região 1q21-1q32 em 83 casos avaliáveis.....	74
Tabela 14	Associação entre o região do gene <i>CDH11</i> em relação ao número dos cromossomos 7, 8, 12 em 114 casos avaliáveis....	75
Tabela 15	Associação entre o região do gene <i>CDH11</i> e o número de cópias dos cromossomos 7, 8, 12 em 83 casos com doença localizada.....	76
Tabela 16	Estimativas de sobrevida global de acordo com os parâmetros clínicos e genéticos de todos os pacientes com Tumores de Ewing e com doença localizada.....	87
Tabela 17	Estimativas de sobrevida livre de evento de acordo com os parâmetros clínicos e genéticos de pacientes com Tumores de Ewing localizado.....	89
Tabela 18	Parâmetros genéticos que mostraram significância estatística em relação à sobrevida dos pacientes nas análises univariadas.....	92
Tabela 19	Análise multivariadas de regressão de Cox dos fatores clínicos-patológicos e genéticos em 131 pacientes com Tumores de Ewing: Sobrevida Global	92
Tabela 20	Análise multivariada de regressão de Cox dos fatores clínicos-patológicos e genéticos em 89 pacientes com Tumores de Ewing localizado: Sobrevida Livre de Doença	93

LISTA DE ABREVIATURAS

BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
CDH11	<i>Caderina</i>
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CEP	Centromeric probe
CGH	Comparative genomic hibridyzation
DAPI II	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DDX59	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 59
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EWS	Ewing sarcoma
EWSR1	Ewing sarcoma region 1
FFEP	Fixado em formalina embebido em parafina
FLI1	Friend Leukemia Intregation 1
GLI1	Glioma-associated oncogene homolog 1
iFISH	Fluorescent in situ hibridyzation interfásico
INK4A	<i>Inhibitors of the cyclin-dependent kinases</i>
KIF14	Kinesin family member 14
LSI/WCP	Hybridization buffer/whole cromosome paiting
m iFISH	Fluorescent in situ hibridyzation metafásico
MDM4	Mouse double minute 4
MYC	Myelocytomatosis homólogo oncogene
PIK3C2B	Phosphoinositide 3-kinase-C2-beta
PNET	Tumor neuroectodérmico primitivo
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Livre de Evento
TE	Tumores de Ewing
TMA	Tissue microarray
TP53	Tumor protein p53
UCSC	Universidade da Califórnia, Santa Cruz

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Fusões do gene EWS-ETS.....	3
1.2	Tratamento dos Tumores de Ewing.....	5
1.3	Valor prognóstico das aberrações cromossômicas em TE.....	6
1.4	Cromossomo 1q (<i>KIF14/DDX59/MDM4/ PIK3C2β</i>)	9
1.5	Cromossomo 16q (<i>CDH11</i>)	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Pacientes e Espécies Tumorais	16
3.1.1	Critérios de Inclusão	16
3.1.2	Critérios de Exclusão.....	16
3.2	Material e Métodos	17
3.2.1	Caracterização da amostra.....	17
3.2.2	Confecção de lâminas de micro arranjo em matriz de tecidos (tissue microarray – TMA)	21
3.2.3	Análises <i>in Silico</i>	22
3.2.4	Linhagem e Cultura Celular de Tumores de Ewing	24
3.2.5	Cultura Celular de Sangue Normal e Obtenção de Lâminas com metáfase.....	25
3.2.6	Construção de Sondas Caseiras por Clonagem em Bactéria.....	26
3.3	Análises Estatísticas.....	46
4	RESULTADOS	49
4.1	Amostras	49
4.2	Reação de Hidridação <i>in situ</i> por Fluorescência-iFISH	51

4.2.1	Análise das Alterações Genéticas	51
6	DISCUSSÃO	94
7	CONCLUSÕES	109
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

ANEXOS

- Anexo 1** Reação de imunistoquímica contra os anticorpos CD99 e FLI-1 aplicados em todos os casos do estudo para revisão histológica.
- Anexo 2** Reação de imunistoquímica contra a proteína FLI1, CD99, CD45, TDT, MYOD1, Miogenina e Desmina.
- Anexo 3** Anticorpos, métodos de recuperação antigênica, reagentes e controles positivos empregados nas reações de imunistoquímica.
- Anexo 4** Ficha de coleta de dados dos prontuários
- Anexo 5** Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 6** Termo de Aprovação e Responsabilidade (doutorado Sanduíche-PDEE/CAPES)
- Anexo 7** Reação de Interfase *in situ* por Fluorescência (*iFISH*)
- Anexo 8** Reação de Metáfase *in situ* por Fluorescência (*MFISH*)
- Anexo 9** Resumo do artigo da tese já submetido à publicação

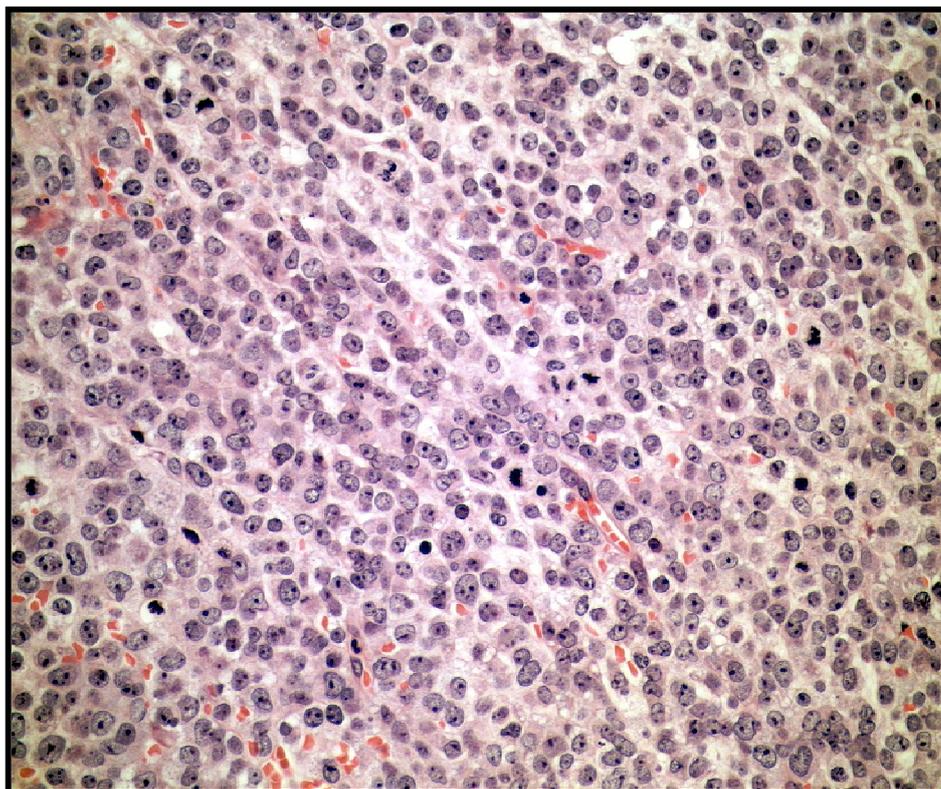
1 INTRODUÇÃO

Pela primeira vez descrito por James Ewing em 1921, os tumores de Ewing (TE) são a segunda neoplasia mais comum do osso em crianças, correspondendo a cerca de 6% de todos os tumores ósseos primários (EWING 2006; PFEIFER 2006). Apesar da sua origem desconhecida, essa neoplasia possui características de células mesenquimais e neuroectodérmicas primitivas, sendo essa última constituída de células embrionárias que migram da crista neural (HOROWITZ et al. 1992; KHOURY 2005; PFEIFER 2006). Sua incidência é maior em meninos e na raça branca, sendo extremamente raros em negros. Semelhante ao osteossarcoma, a idade preferencial de acometimento ocorre na segunda década de vida (KHOURY 2005; SZUHAI et al. 2007).

Os tumores de Ewing têm alta propensão a recorrências locais e metástases à distância (LAHL et al. 2008). Pelo menos 25% dos casos já apresentam metástases ao diagnóstico (BURCHILL 2003). A presença de metástase é um importante fator adverso que afeta a sobrevida de pacientes com TE.

Estudos demonstraram que o tumor neuroectodérmico primitivo (PNET) e tumores de Ewing correspondem à mesma entidade (GRIER 1997). Morfologicamente, são constituídos de células pequenas, arredondadas, citoplasmas escassos, claros e ricos em glicogênio, podendo assim ser identificados mediante coloração com ácido de Schiff periódico

(PAS, sigla em inglês) (Figura 1). Ambos expressam fortemente o antígeno CD99 (produto do gene *MIC2*) (SORENSEN et al. 1993; JÜRGENS 1994; GRIER 1997; BERNSTEIN et al. 2006), à imunohistoquímica.



Fonte: Departamento de Patologia

Legenda: Fotomicrografia da morfologia de tumores de Ewing em coloração de H/E pertencentes à casuística do Hospital A.C.Camargo.

Figura 1 - Imagem histológica representativa tumores de Ewing (H/E)- células pequenas, arredondadas e citoplasmas escassos. 100x

Molecularmente, apresentam as mesmas translocações cromossômicas específicas, sendo a mais comum $t(11; 22)(q24;q12)$. O antígeno *FLI1* (porção do produto de fusão do *EWS-FLI1*) pode ser detectado por imunohistoquímica, apresentando valor diagnóstico (TURCAREL et al. 1983; WHANG-PENG et al. 1984; DELATTRE et al. 1994; ZIELENSKA et al. 2001).

A translocação t(11;22) (q24; q12) está presente em 85-90% dos TE/PNET (KHOURY 2005; PFEIFER 2006; MITELMAN et al. 2011). Essa translocação gera um transcrito da fusão quimérica entre o gene *EWS* (22q12) e *FLI 1* (11q24), principalmente do tipo 1 (consiste na união dos éxons 1-7 de *EWS* com os éxons 6-9 do *FLI 1*, em 60% dos casos) (DELATTRE et al. 1992; DE ALAVA et al. 2000b; JANKNECHT 2005; MHAWECH-FAUCEGLIA et al. 2006). Esse tipo de fusão codifica uma proteína que tem uma atividade de transativação mais fraca e que está associada a baixas taxas proliferativas e também a maiores taxas de sobrevida livre de doença (DELATTRE et al. 1992; DE ALAVA et al. 2000b). Em alguns casos o gene *EWS* pode estar rearranjado com outros oncogenes da família de tumores de Ewing (SANDBERG e BRIDGE 2000; BURCHILL 2003; KHOURY 2005; PFEIFER 2006; SZUHAI et al. 2007).

1.1 FUSÕES DO GENE *EWS-ETS*

Em adição a translocação (11; 22), há translocações cromossômicas variantes como: t(21; 22) (q24; q12) (*EWS-ERG*) ou t(7; 22) (q22; q12) (*EWS-ETV1*), e estão presentes em aproximadamente 5-10% dos TE/PNET (NG et al. 2007; WANG et al. 2007). Outras translocações cromossômicas foram encontradas, porém de forma rara no TE/PNET (menos que 1% dos casos), tais como: t(17; 22) (q21; q12) (*EWS-E1AF*); t(2; 22) (q33; q12) (*EWS-FEV*), inversão do q22 (*EWS-ZSG*) e t(16;21) (p11; q22) (*TLS-ERG*)

(MOROHOSHI et al. 1996; BERTOLOTTI et al. 1996; SHING et al. 2003; NG et al. 2007).

Alguns tumores apresentam alterações cromossômicas secundárias aos rearranjos do gene *EWS*, principalmente ganhos de 1q (ARMENGOL et al. 1997), trissomias do cromossomo 8 (44% dos casos) e 12 (29% dos casos) e der (16) t(1;16) (18% dos casos) (HATTINGER et al. 1996; MAURICI et al. 1998; BURCHILL 2003; MAIRE et al. 2008) e ainda, deleções no braço curto do cromossomo 1. Tais alterações têm sido associadas a pior prognóstico (HATTINGER et al. 1999; SELVARAJAH et al. 2007). Outros autores têm mostrado que ganhos no braço longo do cromossomo 1, resultante de uma translocação não-balanceada t(1; 16), apresenta um impacto negativo na sobrevida dos pacientes com TE/PNET (STARK et al. 1997). Essa aberração cromossômica é uma ocorrência preferencial em outros tipos de neoplasias pediátricas como: tumor de Wilms (SLATER e MANNENS 1992; GRUNDY et al. 1994), retinoblastoma (SQUIRE et al. 1985) e mieloma múltiplo (MUGNERET et al. 1988). SAXENA et al. (2006). Analisando um caso de TE/PNET renal encontraram novas possíveis alterações cromossômicas numéricas, tais como: +3, +18, -15 +19, detectado através da análise do cariótipo de material a fresco. Outros estudos de casos, recentemente publicados, detectaram novas alterações cromossômicas através da análise do cariótipo de um paciente que apresentava metástase no momento do diagnóstico. Tais alterações foram: -9, t(10; 17), t(14;22), t(20;22), t(19;22) (SZUHAI et al. 2007, MAIRE et al. 2008).

1.2 TRATAMENTO DOS TUMORES DE EWING – UMA ABORDAGEM MOLECULAR

A estratégia de tratamento depende de uma série de fatores, tais como, tamanho, localização e estadio do tumor. O tratamento de tumores de Ewing requer a remoção do tumor primário por meio de cirurgia e/ou radioterapia. Algumas vezes, a combinação das duas modalidades de terapia tem maiores chances de sucesso.

Independentemente da extensão do tumor, quase todos os pacientes recebem ciclos de quimioterapia neoadjuvante, variando de acordo com ressecabilidade eventual do tumor. Eles possuem o intuito de reduzir o tamanho do tumor, quando indicada como medida pré-cirúrgica e, pós-cirúrgica, para combater células malignas que não puderam ser removidas.

Aproximadamente 30% dos pacientes apresentam metástases ou micrometástases (não detectáveis pelos métodos habituais de diagnóstico), para as quais a quimioterapia é aplicada com altas taxas de sucesso. No entanto, mesmo aplicando a quimioterapia convencional parece ainda ser incapaz de melhorar a sobrevida dos pacientes com metástase ou doença recorrente. Portanto, uma nova abordagem deve ser tomada. Embora a fusão *EWS-FLI-1* seja necessária para a transformação do processo neoplásico, ela não é suficiente para a progressão do tumor, sem uma interação complexa de moléculas ativadas, tais como: IGF-1R, mTOR, MAPK, PI3K/AKT, EGFR, VEGF (ZHOU et al. 2007). Diante disso, muitas dessas moléculas e outras vias associadas são encontradas desreguladas

nesses tumores, quando avaliados por CGH array, principalmente, em pacientes cujos tumores responderam mal à terapia neoadjuvante, seguindo o protocolo do grupo de EURO-EWING'99 (SCHAEFER et al. 2008). Ainda, outras metas incluem a via de sinalização Wnt (UREN et al. 2004), a via de sinalização Hedgehog (ZWERNER et al. 2008), e a via p53 (DE AVALA et al. 2000a). À medida que as vias reguladoras responsáveis pela transformação, pelo crescimento e pelo desenvolvimento de metástases em tumores de Ewing se tornam mais conhecidas, o número de potenciais terapias-alvos moleculares vai se expandindo em paralelo.

Desta forma, apesar das melhorias significativas na sobrevida, nos últimos 40 anos, para pacientes com doença localizada, esse progresso não tem se estendido a pacientes com metástase ou doença recorrente. Uma melhor compreensão da complexa biologia de tumores de Ewing pode, sem dúvida, fornecer o desenvolvimento de terapias-alvos moleculares eficazes, delineadas através da descoberta de novos biomarcadores prognósticos.

1.3 VALOR PROGNÓSTICO DAS ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM TUMORES DE EWING

Ainda é pouco esclarecido se o papel das aquisições de aberrações cromossômicas pode determinar um pior prognóstico. O prognóstico de TE/PNET tem melhorado com o desenvolvimento de novas técnicas de tratamento e atualmente a taxa de sobrevida é estimada em cerca de 41%, em cinco anos (HATTINGER et al. 2002). Até o momento não há

marcadores moleculares eficazes e confiáveis para identificar pacientes que não respondam bem a quimioterapia.

Alguns fatores têm sido utilizados para predizer um melhor ou pior prognóstico como: estadiamento clínico, localização anatômica e tamanho do tumor. Tumores que apresentam metástases ao diagnóstico e de região pélvica, apresentam tendência a pior prognóstico (JÜRGENS et al. 1988; COTTERILL et al. 2000).

Em pacientes com doença localizada, histologia com pobre resposta a quimioterapia (PICCI et al. 1997), tumor volumoso (JÜRGENS et al. 1988; KOSCIELNIAK et al. 1992) e idade menor que 15 anos ao diagnóstico, têm sido variavelmente associados à resposta clínica adversa (COTTERILL et al. 2000). Portanto, é de grande importância o reconhecimento de marcadores genéticos, ou outros parâmetros sugestivos de pior resposta à quimioterapia para aplicação de um tratamento mais agressivo como terapia mieloablativa, por exemplo.

O tipo de fusão do gene considerado como assinatura genética para os tumores de Ewing – *EWSR1-FLI1*, tem seu valor prognóstico variável até o momento. Estudos retrospectivos de fusão do tipo 1, indicam que essa fusão codifica um fator de transcrição quimérico menos ativo na célula, e está associado a bom prognóstico (ZOUBEK et al. 1996; DE ALAVA et al. 2000b). Todavia, recentes estudos prospectivos refutaram a hipótese da existência de algum benefício prognóstico para a presença da fusão do tipo 1 (LE DELEY et al. 2010; KOVAR 2010), concluindo que não há diferença entre os tipos de fusão desses genes.

Recentemente, deleções do gene *INK4A* (9p21) e alterações do gene *TP53* (17p13) foram utilizadas para definir pequenos grupos de pacientes com pior prognóstico (KOVAR et al. 1997; WEI et al. 2000).

Além disso, alguns marcadores genéticos moleculares, como aumento do número de cópias dos cromossomos 7, 8, 12 e do 1q e a perda de 1p, têm sido relacionados ao estágio avançado da doença, mas ainda é controversa sua relação ao prognóstico de tumores de Ewing (ARMENGOL et al. 1997; THORNER e SQUIRE 1998, KULLENDORFF et al. 1999). Em alguns estudos, todos os casos com ganhos do cromossomo 12, simultaneamente mostraram ganhos do cromossomo 8, sugerindo um envolvimento comum do mecanismo de aneuploidia (Figura 2).

Estudos *in vitro* mostram que células com trissomia do cromossomo 8 podem apresentar um crescimento acelerado do tumor (FAGIOLI et al. 1995; TARKKANEN et al. 1999), e a aquisição de uma cópia adicional do cromossomo 8 em leucemia é um marcador citogenético bem estabelecido de doença avançada (MITELMAN et al. 2011). Além disso, segundo TRAKHTENBROT et al. (2002), a presença da trissomia do cromossomo 8 está associada a fenótipo proliferativo, mas ainda pouco se sabe a respeito das aberrações cromossômicas nos tumores de Ewing.

Ganhos de cromossômicas têm sido associados à doença avançada em muitos tumores sólidos, e parecem refletir a perda do controle da disjunção cromossômica durante a mitose ou/e meiose I (CAHILL et al. 1998; ZIELENSKA et al. 2000).

Embora ganhos dos cromossomos 1, 8 e 12 também tenham sido ligados a pior resposta a tratamentos em outras doenças malignas, em TE/PNET faltam evidências definitivas que confirmem que essas mudanças sejam responsáveis por doença mais agressiva (HATTINGER et al. 2002).

Pouco se sabe sobre a evolução de pacientes com tumores de Ewing/PNET. Trabalhos que utilizaram métodos de citogenética molecular mostram inconsistência de resultados para identificar e confirmar a influência de aberrações cromossômicas secundárias no prognóstico de pacientes com TE. Este trabalho é favorecido pela presença de uma grande série de pacientes, o que vai dar suporte para nossas conclusões. Indubitavelmente, estudos envolvendo a busca de novos marcadores genéticos irão ajudar a reconhecer tumores de Ewing/PNET com propensão à recorrência local ou doença avançada.

1.4 CROMOSSOMO 1q (*KIF14/DDX59/MDM4/PIK3C2B*)

O cromossomo 1 tem sido reportado com um significativo papel na oncogêneses de diversos cânceres humanos, tais como retinoblastoma, glioblastoma, mama e laringe (BAUDIS 2009). Acreditam-se que ganhos de material genético no braço longo do cromossomo 1q são uma das anormalidades cromossômicas mais recorrentes em várias neoplasias, incluindo os tumores da família Ewing (ARMENGOL et al. 1997; HATTINGER et al. 2002, CORSON et al. 2005). A alteração genética em 1q parece ser uma característica de diversos tumores e indica a presença de

um ou mais oncogenes com proeminente papel em tumorigêneses. Estudos anteriores têm identificado através de aCGH que a região 1q31-1q32 como mínima região de ganho mais frequente (RIEMENSCHNEIDER et al 2003; CORSON et al. 2005). Estudos subsequentes de análises de expressão de diversos genes revelou **1q32.1** como região de mínima recorrência e atribuiu a alta expressão de *KIF14* e *MDM4* como potenciais candidatos oncogênicos responsáveis por dirigir a progressão maligna. Evidências mostraram que *KIF14*, membro da família de kinesinas mitóticas, codifica uma proteína responsável pela manutenção da segregação cromossômica durante a mitose, porém podendo manifestar aberrante número de cópias e alta expressão gênica em vários cânceres (CORSON et al. 2007, MADHAVAN et al. 2007; MARKOWSKI et al. 2009). Entretanto, o gene *MDM4*, também localizado no locus 1q32.1, tem sido relatado o seu potencial oncogene, principalmente quando envolvido na progressão celular via inativação do gene p53 (DE AVALA et al. 2000a). Estudos baseados em *array* DNA (aCGH) e número de cópias gênicas (FISH) indicaram *MDM4* como um importante candidato oncogênico devido ao seu elevado número de cópias genômicas, aumento na expressão do seu transcrito e, aumento de expressão proteica em vários tumores humanos (CORSON et al. 2005). Todavia, nenhum estudo em tumores de Ewing foi reportado até o momento. Em adição a esses genes descritos acima, o gene *DDX59* e o *PIK3C2 β* , também residem nesse locus.

O gene *DDX59*, é pertencente a família *Box DEAD* de RNA helicases que controla a ligação da molécula de ATP e a hidrólise celular. Esse gene

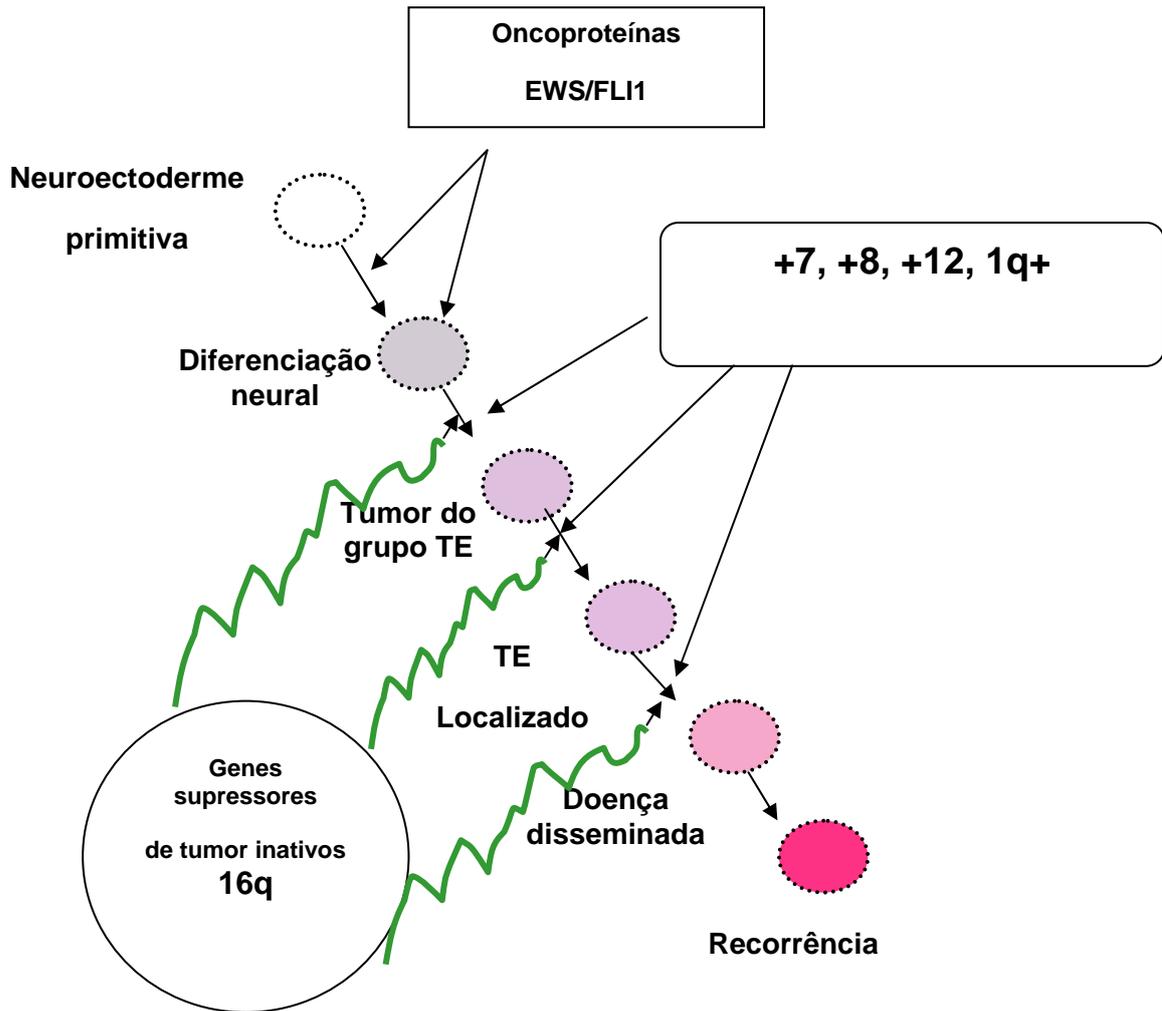
encontra-se relacionado com o processo de tumorigênese em tumores de cólon-reto e mama, com importante valor como alvo diagnóstico e terapêutico (SJÖBLOM et al. 2006). Já o gene, *PIK3C2 β* é um variante gene promissor da família PI3K com função envolvida na regulação de vários processos celulares, incluindo crescimento celular, proliferação, apoptose, motilidade, angiogênese, diferenciação e transporte intracelular (FOSTER et al. 2009). Alterações genéticas como, mutação, amplificação e rearranjos nos genes da via PI3K e seus subsequentes alvos gênicos têm sido observados em vários cânceres (VIVANCO et al. 2007, BOORMANS et al. 2010, LI et al. 2011). Devido ao seu significativo envolvimento na proliferação celular, a maioria dos estudos nessa via tem focado no seu potencial como alvos de terapias anti-cânceres. Apesar do importante papel dessa via na progressão do câncer, a função dos genes variantes da via PI3K, não têm sido muito especulada. *PIK3C2 β* , molécula que possui um importante papel na via de sinalização PI3K/AKT, regulando um grande número de processos celulares (KNOBBE et al. 2005), apresenta-se amplificada em glioblastoma (VAN DEN BOOM et al. 2003), mas até o momento, não há achados em tumores de Ewing.

1.5 CROMOSSOMO 16q (*CDH11*)

Através de análises do banco de dados de aberrações cromossômicas em câncer (http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitel_Search#MARK), observamos um vasto envolvimento de aberrações

numéricas e estruturais do cromossomo 16 em vários tumores sólidos e não-sólidos, como adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de pulmão e leucemia mielóide aguda. Especificadamente, o locus **16q21**, onde reside o *CDH11*, um potencial supressor tumoral envolvido na adesão e migração celular, tem sido associado com a progressão de muitas neoplasias, como osteossarcoma (NAKAJIMA et al. 2008) e retinoblastoma (MARCHONG et al. 2004), devido aos defeitos na interação célula-célula e célula-matriz que são umas das marcas de progressão tumoral. Outros estudos também têm indicado que, a expressão de *CDH11*, está envolvida na progressão da doença e na sobrevida em pacientes com osteossarcoma. Além disso, o gene *CDH11* possui um sítio de ligação para o gene beta-catenina, o que indica a sua interação com proteínas da via WNT para a manutenção da adesão célula-célula. Estudos em *mRNA* mostraram que a sua aumento de expressão está associada com prognóstico ruim em pacientes com tumores de Ewing (OHALI et al. 2004), mas nenhum estudo descreveu o número de cópias desse gene e a sua relação com prognóstico nesta neoplasia.

Portanto, de acordo com o exposto, este presente estudo procura identificar novos marcadores genéticos que irão ajudar a reconhecer tumores de Ewing com propensão à recorrência local ou doença avançada, permitindo estabelecer tratamentos mais intensos para esses pacientes.



Fonte: Modificada de DESMAZE et al. (1994).

Legenda: As primeiras alterações genéticas estão relacionadas ao TE (Tumores de Ewing) ou a posterior diferenciação neural que ocorre no PNET. Alterações cromossômicas secundárias levam à doença progressiva.

Figura 2 - Modelo esquemático de eventos genéticos em tumores do grupo de TE que levam à doença avançada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar novas alterações genéticas em amostras de tumores de Ewing, através da técnica de interfase FISH, visando identificar novos marcadores prognósticos que possam ser usados para estratificar do risco de evolução desfavorável e, conseqüentemente, direcionar a um tratamento com regimes mais intensivos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse estudo são:

- Construir lâminas de TMA e um banco de dados com características clínico-patológicas em pacientes portadores de tumores de Ewing, visando à instalação de uma linha de pesquisa específica no Hospital A.C. Camargo;
- Associar os dados genéticos com as características clínico-patológicas (extensão da doença, sítio do tumor primário, local da metástase, recorrência e sobrevida global e livre de doença) e epidemiológicas (idade, sexo) coletados dos pacientes, visando estabelecer perfis genéticos para diferentes condições clínicas;

- Avaliar o perfil de translocações e/ou outras alterações cromossômicas em lâminas de TMA, através da técnica de interfase FISH. Associar as translocações específicas (*EWSR1-FLI1*) de tumores de Ewing, já descritas na literatura, e alterações secundárias (cromossomos +7, +8, +12, 1q+ e 16q-), a fim de verificar padrões citogenéticos que possam ser usados como marcadores prognósticos dessa doença.

3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES E ESPÉCIES TUMORAIS

Resumidamente, foram incluídos no estudo pacientes admitidos no Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente, São Paulo, Brasil, no período de 1975 a 2008, com diagnóstico de tumores de Ewing. A partir de uma amostra 306 pacientes, 226 casos puderam ser resgatados do arquivo (lâminas e blocos) para reavaliar o diagnóstico e o tipo histológico da neoplasia. Destes, 175 casos foram selecionados para análise pela técnica de imunoistoquímica, com o propósito de confirmação diagnóstica. E ao final, 132 casos com tumores de Ewing foram incluídos neste estudo.

3.1.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes portadores de tumores de Ewing admitidos neste hospital, confirmados por imunoistoquímica and interfase FISH (*EWSR1/FLI1*);
- Casos que apresentaram materiais arquivados (blocos de parafina) com quantidade suficiente de tumor para o estudo.

3.1.2 Critérios de Exclusão

Casos que apresentaram material tumoral sem condições de estudo IHQ/FISH ou avaliados por descalcificação excessiva e/ou extensa necrose

tumoral. Pacientes que não possuíam dados clínico-patológicos completos nos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital A.C. Camargo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Caracterização da amostra

Primeiramente, para o desenvolvimento deste trabalho, foram estudados os 226 casos recuperados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente, com seus respectivos blocos e lâminas entre os anos de 1975 e 2008. De todas as lâminas e seus respectivos blocos de parafina dos casos em questão, foram obtidos novos cortes e coloração em Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas de cada bloco foram revisadas pelo autor e pela patologista do departamento de Anatomia Patológica (IWC), para confirmação diagnóstica e para seleção da lâmina com a quantidade mais representativa do tumor.

Após esta análise, foram excluídos 51 casos, restando 175 casos selecionados para realização da técnica de imunistoquímica. Nesta etapa do trabalho, as reações de imunistoquímica foram analisadas pelo autor e por dois patologistas, (IWC e RF), do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Para a revisão dos diagnósticos, foram analisadas as imunorreatividades das proteínas CD99 e FLI-1 para todos os casos (Anexos 1 e 2). Ainda, outros anticorpos foram incorporados a casos

que exigiram um painel mais amplo de marcadores, como, por exemplo, marcadores linfóides, epiteliais e de diferenciação rabiomioblásticas, a fim de se chegar ao diagnóstico final. O protocolo e os anticorpos utilizados, encontram-se no Anexo 3. Também para confirmação diagnóstica, análise da translocação t(11;22) foi verificada, encontrando-se 95.5% dos casos positivos para o rearranjo do gene *EWS*. Dos quais, 121 (89.6%) casos apresentaram a fusão *EWSR1/FLI1*, 8 (5.9%) casos apresentaram somente o rearranjo do gene *EWS* e, 3 (2.3%) casos apresentando somente forte positividade para CD99. O restante dos casos foram considerados não informativos para a análise de FISH (falta de material tumoral na lâmina).

As lâminas dos pacientes selecionados com os respectivos blocos foram separadas para a confecção do *Tissue Microarray* (TMA), através do TMA "Arrayer" (Manual Tissue Arrayer, Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA). Para a confecção do TMA, 108 casos de tumores de Ewing foram incluídos, e 24 casos foram colocados em lâminas individuais, uma vez que a neoplasia era escassa, não apresentando material suficiente para serem incluídos em lâminas de TMA (Figura 3).



Figura 3 - Exemplar de lâmina utilizada para análise de iFISH em corte convencional dos 24 casos não incluídos no TMA. Cada lâmina continha 2-3 cortes de amostras diferentes.

Posteriormente, os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos arquivados no SAME do Hospital A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente. Após a coleta dos dados clínico-patológicos, dois casos presentes no TMA foram excluídos para o estudo estatístico, por não possuírem dados clínicos completos.

Os dados coletados foram registrados em uma ficha de levantamento de dados previamente definida (Anexo 4). Em seguida, uma análise retrospectiva dos dados obtidos foi realizada. Ao final, 132 casos foram incluídos neste estudo, dos quais, 115 casos correspondem a tumores primários e 17 casos representam metástases, sendo que em 4 casos havia o tumor primário e a metástase pareados. A Tabela 2 que apresenta as características clínico-patológicas dos 132 pacientes com tumores de Ewing

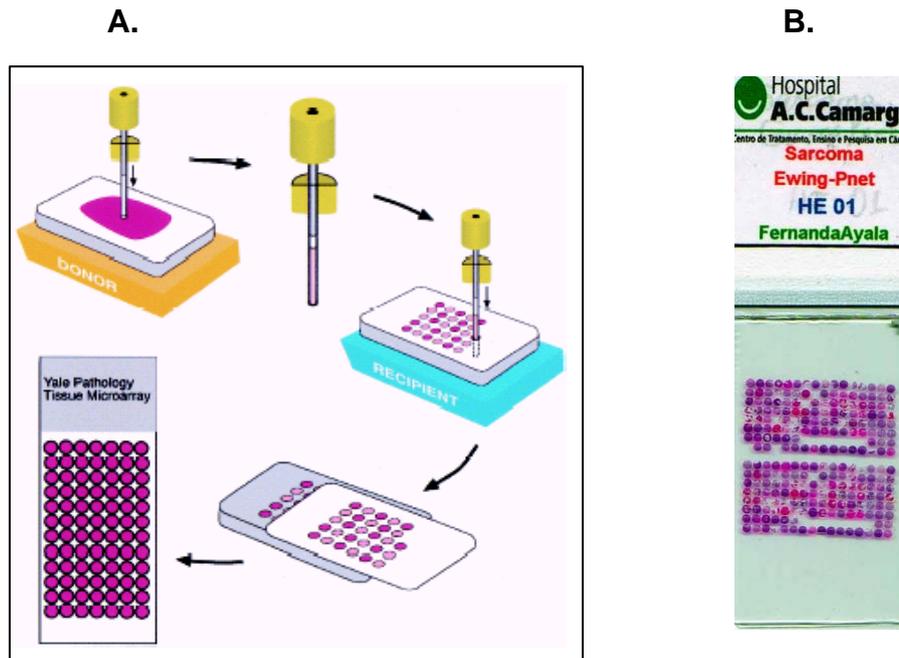
do estudo, encontra-se nos resultados. Da caracterização da amostra, a idade média dos pacientes com tumores de Ewing ao diagnóstico foi de 15 anos (variando de 0.25 meses - 52 anos). Desses, 79 pacientes eram do sexo masculino (59.8%) e 53 do sexo feminino (40.2%). Os sítios tumorais mais freqüentes no momento do diagnóstico nos 95 casos com doença localizada foram: extremidade inferior (n = 43), seguido da extremidade superior (n = 22), pelve (n = 16), da parede do tórax (n = 12), face (n = 1) e parede abdominal (n = 1). Dos 37 pacientes com doença disseminada no momento do diagnóstico, os locais mais frequentes foram pelve (n = 13) e extremidade inferior (n = 15), ainda, 9 pacientes apresentaram outros sítios de localização do tumor primário, todos com menos de 8 centímetros. A maioria dos tumores era de origem óssea (n=121). A mediana do tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico da doença localizada foi de 5 meses (variação de 0,17-60 meses). Os sintomas mais comuns foram dor local e edema (n = 59), seguidos por somente dor local (n = 39). Enquanto que para doença disseminada, o tempo médio foi também o de 5 meses (0,5 - 36 meses). Nesses casos, os sinais precoce da doença de Ewing mais comuns foram somente dor local (n = 17), seguido de edema (n = 8). O tratamento quimioterápico desses pacientes seguiram os protocolos do Hospital A.C. Camargo de acordo com o período correspondente ao diagnóstico. Portanto, os pacientes foram incluídos em tratamento de poliquimioterapia, medidas de controle local com radioterapia e cirurgia, ou uma combinação destes como apropriado para o período do estudo. As drogas mais utilizadas foram: ifosfamida, adriamicina ciclofosfamida,

etoposide, vincristina e actinomicina. A radioterapia foi indicada para tumores irressecáveis, operados ou parcialmente ressecáveis, tumores em pacientes com doença metastática, e também como tratamento paliativo (COSTA et al. 2000). Dos 132 casos, 102 pacientes foram tratados com o tratamento pré-operatório e 28 pacientes não foram tratados com quimioterapia ou radioterapia, a situação terapêutica era desconhecida para dois pacientes. Este estudo foi analisado e aprovado pelo Conselho de Revisão Ética do Hospital A.C. Camargo em outubro de 2007 e pelo Programa de Estágio no Exterior (Anexos 5 e 6)

3.2.2 Confeção de Lâminas de Micro arranjo em Matriz de Tecidos (*tissue microarray – TMA*)

Os casos selecionados após a revisão diagnóstica foram utilizados na confecção de um bloco de TMA. A área tumoral foi identificada no bloco de parafina doador, foi puncionada com agulha de 1 mm e os cilindros foram transferidos para o bloco receptor (ANDRADE et al. 2007). As amostras foram inseridas em duplicata nos seus respectivos blocos. Em seguida, foi construído um mapa com a identificação detalhada de cada caso para posterior localização destes. Foram realizados cortes seqüenciais de 3µm de espessura e colhidos em lâminas adesivas para a construção de TMA (Instrumedics, Hackensack NJ - EUA) (Figura 4). Todos os cortes foram colhidos em uma única vez e armazenados para uso posterior. O controle do número de casos avaliáveis foi realizado através da coloração com Hematoxilina-Eosina a cada 25 cortes e com a contagem de cilindros

presentes. Um caso foi definido como adequado quando o tumor ocupou pelo menos 25% da área total do cilindro. O TMA foi considerado esgotado quando mais que 25% das amostras não eram adequadas para análise ou não se encontravam na lâmina.



Fonte: RIMM et al. (2001)

Legenda: Representação esquemática da confecção de lâminas de *Tissue Microarray*.

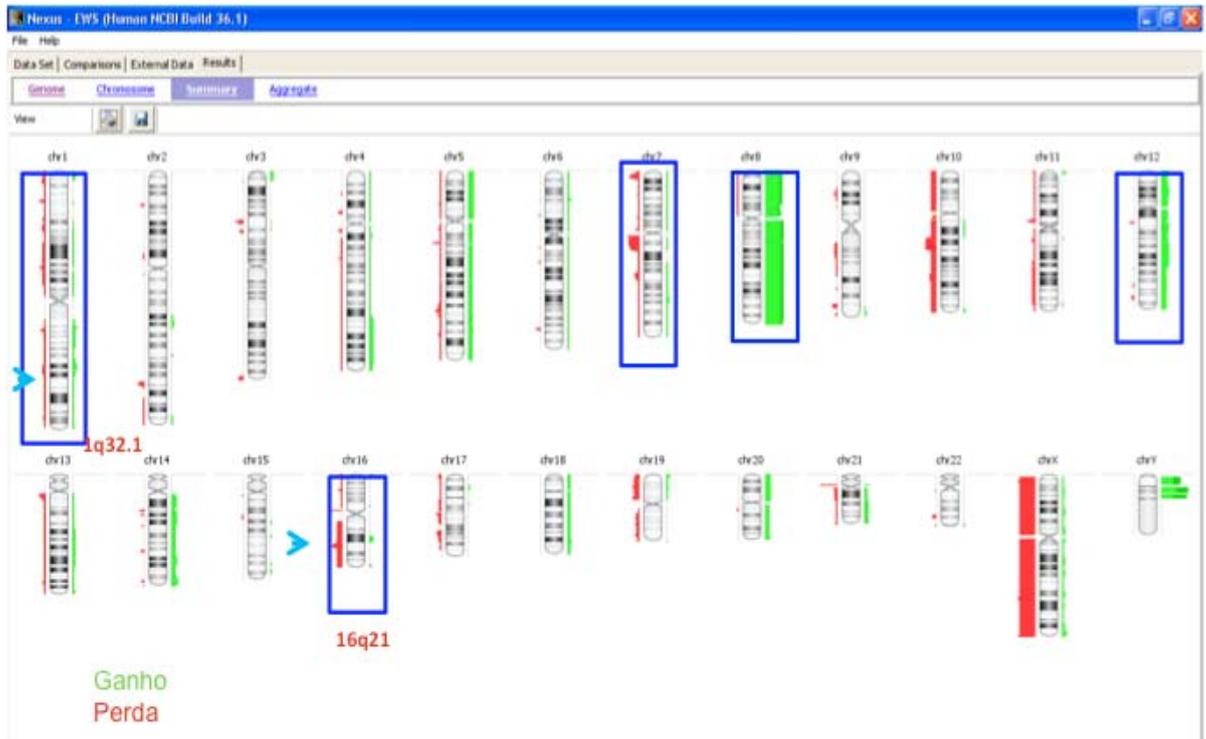
Figura 4 - (A) Esquema mostrando montagem do bloco de TMA e lâmina para análise e (B) Exemplo de lâmina de TMA em duplicata utilizada para as análises de iFISH.

3.2.3 Análises *in Silico*

O estudo foi delineado através de análises de bioinformática utilizando as bases de dados de citogenética (BAUDIS 2009) e o programa de computador, *Nexus*, versão 2005 (Biodiscovery Inc., El Segundo, CA 90245 USA), visando às análises de número de cópias gênicas mais

frequentes/recorrentes em tumores de Ewing (Figura 5). Para a análise no programa *Nexus*, foram utilizados dados publicados recentemente, armazenados e disponíveis em banco de dados públicos (GEO, NCBI-GSE8398-Agilent_44k_25 amostras de tumores de Ewing e GSE 15696 - Affymetrix Mapping 250K Nsp SNP Array). As análises por esse programa foram feitas de acordo com os algoritmos padrões determinados pelo fabricante (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA 90245 USA).

A.



B.



Legenda: A) Perfil genômico de 25 pacientes com tumores de Ewing pela técnica de Microarray-base de hibridação genômica comparativa (CGH array). Estudo encontrado no banco de dados – NCBI/GEO database = GSE8398-Agilent_44k; B) Perfil genômico de 27 pacientes com TE pela técnica de CGH array. Estudo encontrado no banco de dados – NCBI/GEO database = GSE 15696. Affymetrix Mapping 250K Nsp SNP Array.

Figura 5 - Ideogramas de representação cromossômica dos resultados de análises *in silico* obtidos pelo programa Nexus para analisar a presença e a frequência de aberrações em locus cromossômicos. As alterações genéticas em 1q32.1, 16q21 e, em cromossomos inteiros 7, 8 e 12 foram as mais comumente encontradas.

3.2.4 Linhagem e Cultura Celular de Tumores de Ewing

A linhagem celular Hs. 822T de sarcoma de Ewing foi adquirida da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, # **CRL-7556TM**) e foi usada como controle da análise citogenética t(11; 22) pela técnica de interfase FISH (iFISH). A linhagem celular foi cultivada de acordo com o protocolo do fornecedor. Resumidamente, as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen,

Carlsbad, CA, Burlington, ON, Canadá), e colhidas por tripsinização, seguido de lavagem com PBS, e subsequente fixação em formol a 10%. O sedimento celular resultante foi em seguida emblocado em parafina, cortados em secções (5µm) e colocados em 10 lâminas de vidro (Fisher Scientific) prontas para aplicar a técnica de iFISH (Figura 6).

3.2.5 Cultura Celular de Sangue Normal e Obtenção de Lâminas com Metáfase

As células sanguíneas (linfócitos) utilizadas para controle positivo das sondas caseiras foram cultivadas de acordo com o protocolo de procedimento padrão de técnicas citogenéticas do laboratório do Prof. Jeremy Squire (Queens University, Kingston, ON, Canadá). As células foram cultivadas e alimentadas sincronizadamente, de dois em dois dias consecutivos em meio RPMI 1640 (Cultilab ®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA, Burlington, ON, Canadá), 1% L-Glutamina (Gibco ®), 1% de penicilina/estreptomicina (Cultilab ®) e colchicina (0.1µg/ml, Karyomax) (meio completo). Após uma semana de cultivo sincronizado, as células sanguíneas foram suspensas com solução hipotônica (KCL, 0.075M) à temperatura de 37°C por 15 a 25 minutos e, então, centrifugadas (1000 rpm) por 10 minutos e, enfim, fixadas com solução de fixador gelado (3 metanol absoluto: 1 ácido acético glacial). Após a aplicação da solução fixadora, a suspensão celular foi submetida novamente à centrifugação (10 000 rpm) por 5 minutos, repetindo-se esse procedimento de fixação por mais duas vezes. Posteriormente, para evitar a

evaporação da solução fixadora, o tubo foi armazenado a temperatura de -20°C, até o momento do preparo de lâminas com metáfase por choque térmico. As lâminas de metáfase foram feitas em lâminas limpas (Fisher Scientific) e imersas em água deionizada e resfriadas a aproximadamente a 8°C por 12 horas antes do procedimento. Em microscópio de contraste de fase, o melhor campo da lâmina foi escolhido e delimitado com a utilização de lápis de vídia para posterior orientação no procedimento de metáfase FISH usada como controle da marcação do gene-alvo por sondas caseiras bacterianas.

3.2.6 Construção de Sondas Caseiras por Clonagem em Bactéria

BAC ou do inglês, *Bacterial Artificial Chromosome* é a construção do DNA, baseado na fertilidade de um plasmídeo artificial (F- plasmídeo), usado na clonagem e transformação em bactéria, geralmente com a *E. Coli*. O tamanho da sequência de nucleotídeo inserida na BAC, geralmente é de 150-350 Kpb, podendo chegar a 700 Kpb. As BACs são, frequentemente, usadas para sequenciar o genoma de organismos em projetos genoma, como por exemplo, o projeto Genoma Humano.

Para o desenvolvimento da ferramenta de análise pretendida, a sequência nucleotídica, a posição (ordem linear), a distância e os nomes dos clones bacterianos foram selecionados pelo *Human March 2006*, depositados na biblioteca virtual *UCSC Genome Browser* (Karolchik, Kuhn, et al. 2008). Esses clones foram testados quanto a especificidade através de alinhamento local (BLAST) contra as sequências nucleotídicas de inúmeros

organismos depositados neste banco genômico. Em seguida, os clones selecionados foram adquiridos em uma placa de Petri da coleção do Hospital "Sick Kids", Toronto, Canadá. Para confirmação da viabilidade, as colônias de BAC transformadas oriundas do Hospital referido, foram semeadas em uma nova placa de Petri de ágar, com uma ponteira estéril e incubadas em uma estufa a 37°C por 24 horas. Com outra ponteira estéril, as colônias bacterianas isoladas foram inoculadas e inseridas em um tubo de polipropileno contendo meio líquido, Luria Bertani (LB), com o antibiótico adequado, em seguida incubada a 37°C, 220 rpm (C25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, NJ, USA), por 12-16 horas. No dia seguinte, a extração do DNA de plasmídeo bacteriano foi realizada.

Para esse estudo, os seguintes clones de BACs foram selecionados da biblioteca virtual de *RP11 (Roswell Park)*: para os genes da região 1q32.1: RP11- 92G12 e RP11-143F20 (*KIF14/DDX59*) e RP11-97B14 e RP11-433N15 (*MDM4/PIK3C2B*). Já para a região de 16q21-16q22: RP11-135L12/RP11- 22903/RP11- 316K24 (*CDH11*), ainda, para a mesma região, servindo como sondas-controle, as BACs RP11-266K10/RP11-529K1 e RP11-262G6/RP11-89O14/RP11-11E14 (16q22), localizadas respectivamente, nas regiões anterior e posterior do gene de interesse, *CDH11*.

- **A Extração de DNA de Clones Bacterianos**

O isolamento do DNA bacteriano foi realizado pelo método de lise alcalina. Este protocolo foi uma modificação do protocolo padrão do

fabricante, QIAGEN-*Tip miniprep Kit* (Qiagen, Valencia, California, USA), usado para isolar no mínimo 10ug de DNA purificado, a partir de culturas em meio líquido - Luria Bertani. Brevemente, este procedimento consistiu dos seguintes passos: (1) Preparação/Suspensão celular; (2) Lise celular; (3) Remoção de proteínas e DNA de *E. Coli*; (4) Precipitação (Álcool); (5) Lavagem do precipitado; (6) Suspensão do DNA plasmidial. Todos os passos citados foram realizados sem o uso da coluna com membrana de sílica ou de resina, e sem o uso do tampão TE (Tris –EDTA), sugeridos pelo fabricante.

Em seguida, a integridade do DNA extraído foi inferida através da aplicação da amostra em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio 10 mg/mL e visualizado em luz UV (FluorChem. 8900 Multimage, Alpha Innotech Corporation, California). A presença de uma banda única foi indicativo de que o DNA alvo estava puro, bem dissolvido e não degradado.

Posteriormente, o mesmo foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop® ND- 1000 UV-VIS, Spectrophotometer – Agilent Technologies V3.3.0, USA). A concentração de ácidos nucleicos em solução foi calculada em comprimento de onda de 260 nm, considerando-se que 1 DO_{260nm} equivale a 50 ug/mL de DNA. O grau de contaminação com proteínas foi estimado a partir da relação entre as leituras efetuadas a 260 e 280 nm, devendo o valor variar de 1.8 a 2.0.

A especificidade das sequências nucleotídicas foram testadas pela reação de amplificação em cadeia (PCR) com um par de iniciadores específicos a cada sequência-alvo de interesse, com visualização do

produto (presença de uma única banda) em gel de agarose (1%), em tampão TAE (0.5%).

Por fim, a partir do DNA plasmidial extraído de cada um dos clones das bactérias do estudo, efetuou-se a marcação da sequência-alvo complementar pela reação de *Nick translation*.

- **Reação de *Nick translation***

A reação de *Nick Translation* foi realizada usando *Vysis Nick Translation Kit* (Abbott Molecular), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, o qual já foi publicado anteriormente (MERSCHER et al. 1997; MAIRE et al. 2009). Basicamente, esta reação consistiu da incorporação de fluoróforos ligados a nucleotídeos (dUTPs), comercialmente disponíveis: *SpectrumGreen-dUTP*[®], *SpectrumOrange-dUTP*[®] (Abbott Molecular – Vysis Inc.) or *SpectrumRed-dUTP*[®] (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA) aplicados à sequência-alvo complementar. O locus-específico de cada clone bacteriano e a qualidade da intensidade do sinal foram confirmados pela reação de metáfase FISH (mFISH), em amostras de sangue normal. A presença de sinais inespecíficos descartavam o clone do estudo; já a presença de sinais fracos foram indicativo de ineficiente incorporação de fluoróforos à sequência-alvo, o que foi sugestivo de fraca visualização do sinal em reações de interfase FISH (iFISH) de material fixado em formalina e parafinado.

- **Reação de Hibridação *in situ* por Fluorescência - FISH**

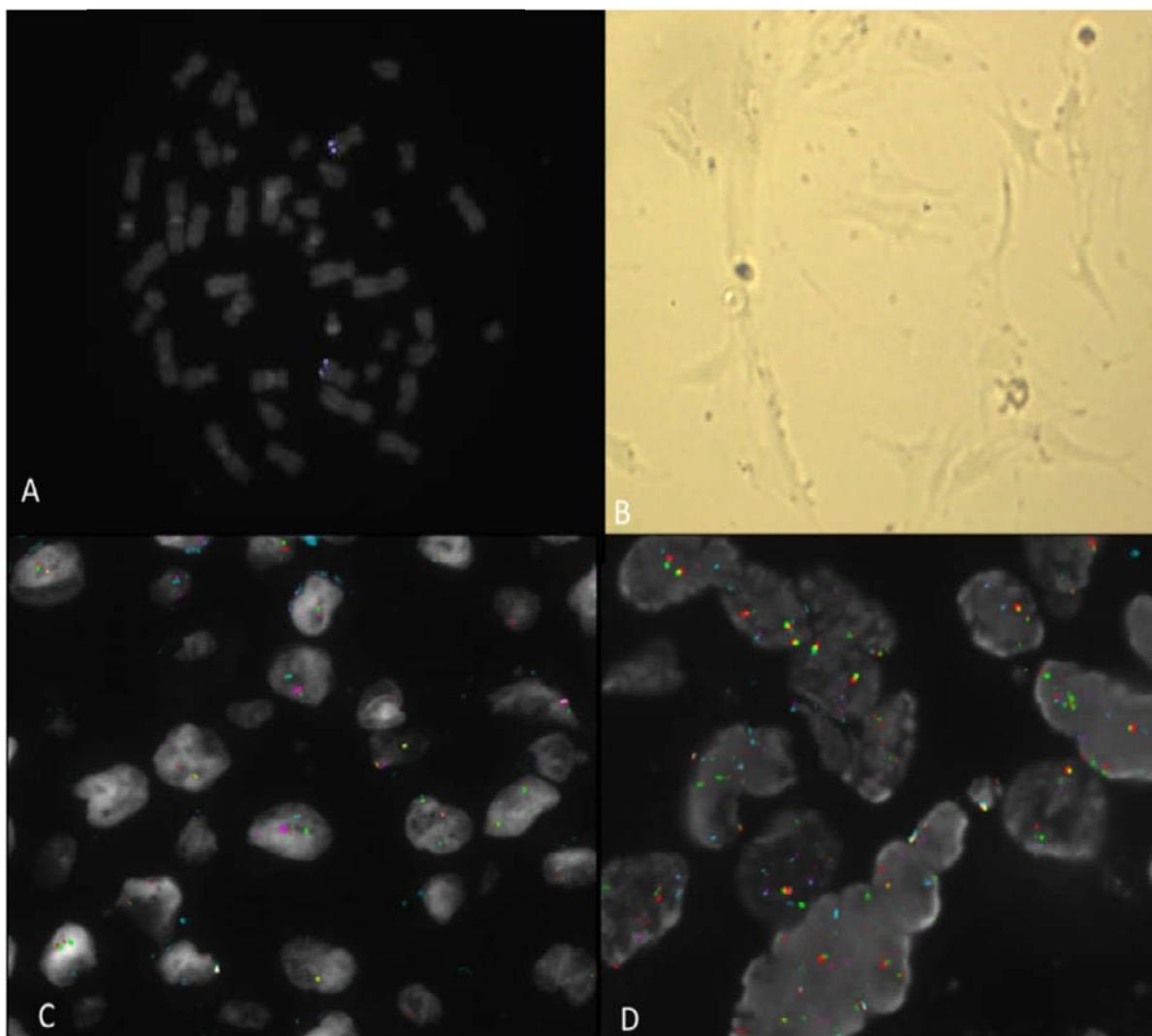
Sondas utilizadas para detecção de alterações cromossômicas

Primeiramente, foram desenhadas sondas de BAC para a confirmação diagnóstica das amostras pela Citogenética Molecular, onde foram usados a sonda caseira do *FLI1* juntamente com a sonda comercialmente disponível para *EWSR1*, e, como resultante, obtivemos a presença ou ausência da fusão desses genes, como visto no controle-positivo da linhagem celular (Figura 5).

Em seguida, confeccionamos as sondas de BAC para mapear a região 1q32.1 de, aproximadamente 4Mpb, onde estão situados os genes - *KIF14/DDX59* e *MDM4/PIK3C2B*. Além das sondas (BAC) para a região 1q32.1, também foram utilizadas outras duas sondas caseiras para marcar a região proximal do centrômero do cromossomo 1 - 1q21 (RP11- 196G18 e RP11- 541H15), usadas como controle do número de cromossomo 1 (Figura 7). Para a região 16q21 (região da Caderina osteoblástica - *CDH11*), quatro BAC de sondas-controle - RP11-266K10/RP11-529K1 e RP11-262G6/RP11-89O14/RP11-11E14 (16q22) foram obtidas para marcação dessa área de aproximadamente 11.8Mpb, além de uma sonda comercial centromérica (DNA alfa-satélite) (Abbott Molecular - Vysis) para o cromossomo correspondente (Figura 8). A nomenclatura genética utilizada foi a internacional descrita pela International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) (MITELMAN 1995). Os DNAs extraídos de BAC foram

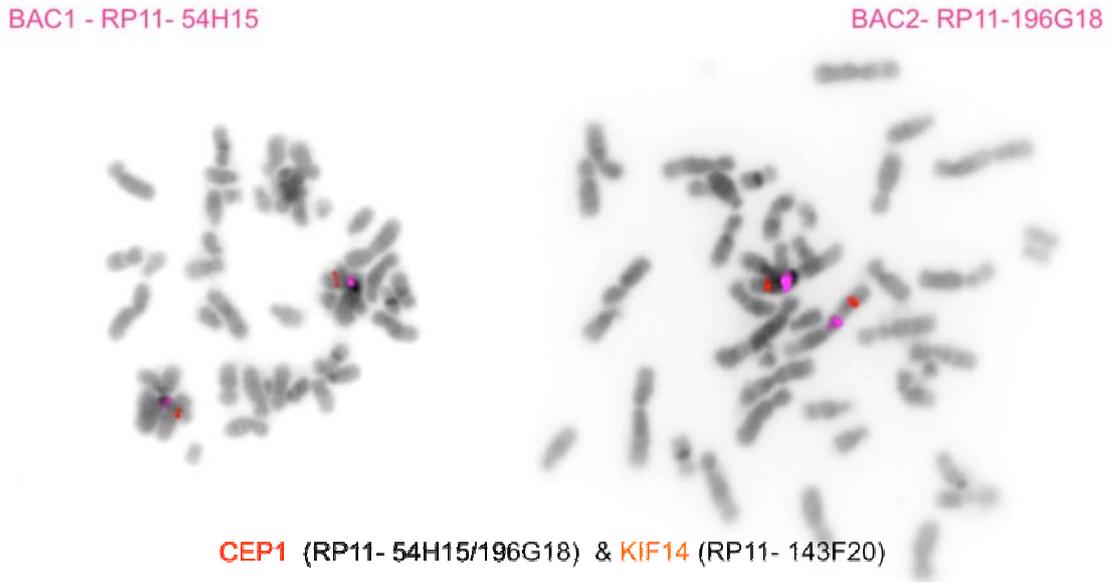
marcados por *Nick Translation* com os fluoróforos: verde, vermelho, e/ou laranja (Abbott Molecular - Vysis).

Para a análise do número de cópias dos cromossomos 7, 8 e 12, foram usadas sondas de sequência de DNA alfa-satélite disponíveis comercialmente (D7Z1, D8Z2 e D12Z3, respectivamente (Abbott Molecular - Vysis). Enfim, as lâminas de TMA foram hibridadas com essas sondas por no mínimo 18 horas e lavadas com soluções já padronizadas para FISH e contra-coradas com DAPI II - *4',6-diamidino-2-phenylindole* (Vectashield®). A Tabela 1 sumariza as sondas caseiras e comerciais utilizadas neste estudo. A estratégia das reações de iFISH realizadas neste trabalho está apresentada na Figura 9.



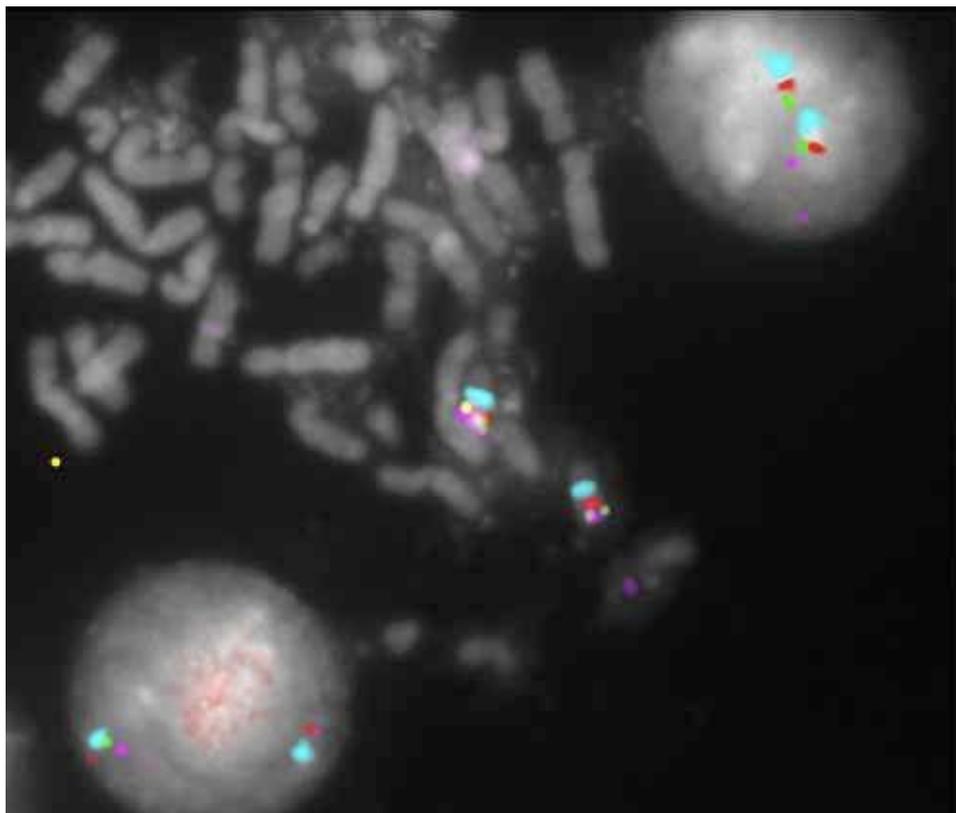
Legenda: A) Validação da sonda caseira para o gene *FLI-1* (5' – azul; 3' - rosa) pela mFISH, 63x ; B) Cultura de linhagem celular de tumores de Ewing (TE) (Hs 822T- ATCC), 100x; C) Controle positivo da reação de iFISH - Linhagem celular de TE em FFEP, 63x. Vê-se a união dos sinais laranja e rosa, indicando a fusão dos genes *EWSR1-FLI1*; D) Controle negativo da reação de iFISH – tecido normal de placenta. Vê-se que os sinais verde e laranja encontram-se unidos, sem quebra do gene *EWS* 100x.

Figura 6 - Reações de mFISH e iFISH para validação da alteração genética do gene *EWS*.



Legenda: Representação de duas metáfases FISH de linfócitos de sangue normal para a validação da região locus-específico de 2 BACs (cor *pink*) posicionadas na região pericentromérica da região do cromossomo 1 (1q21). À esquerda, encontra-se a sonda caseira de BAC, RP11- 54H15 em *pink*, usada para controle, juntamente com a sonda BAC – RP11- 143F20 do gene-alvo. À direita, mostra a hibridação da BAC pericentromérica RP11-196G18 (*pink*), hibridada com a BAC situada no locus 1q32.1 (laranja), usadas nas análises de iFISH. As BACs adjacentes ao centrômero do cromossomo 1 estão situadas a 6Mpb de distância do centrômero 1 (1q11.1). A BAC RP11-143F20 compreende a região genômica do *KIF14/DDX59* (direção ao telômero), que corresponde a 4Mpb de extensão.

Figura 7 - Validação da região locus-específico, 1q21 e 1q32.1, das sondas caseiras de BAC por metáfase FISH.

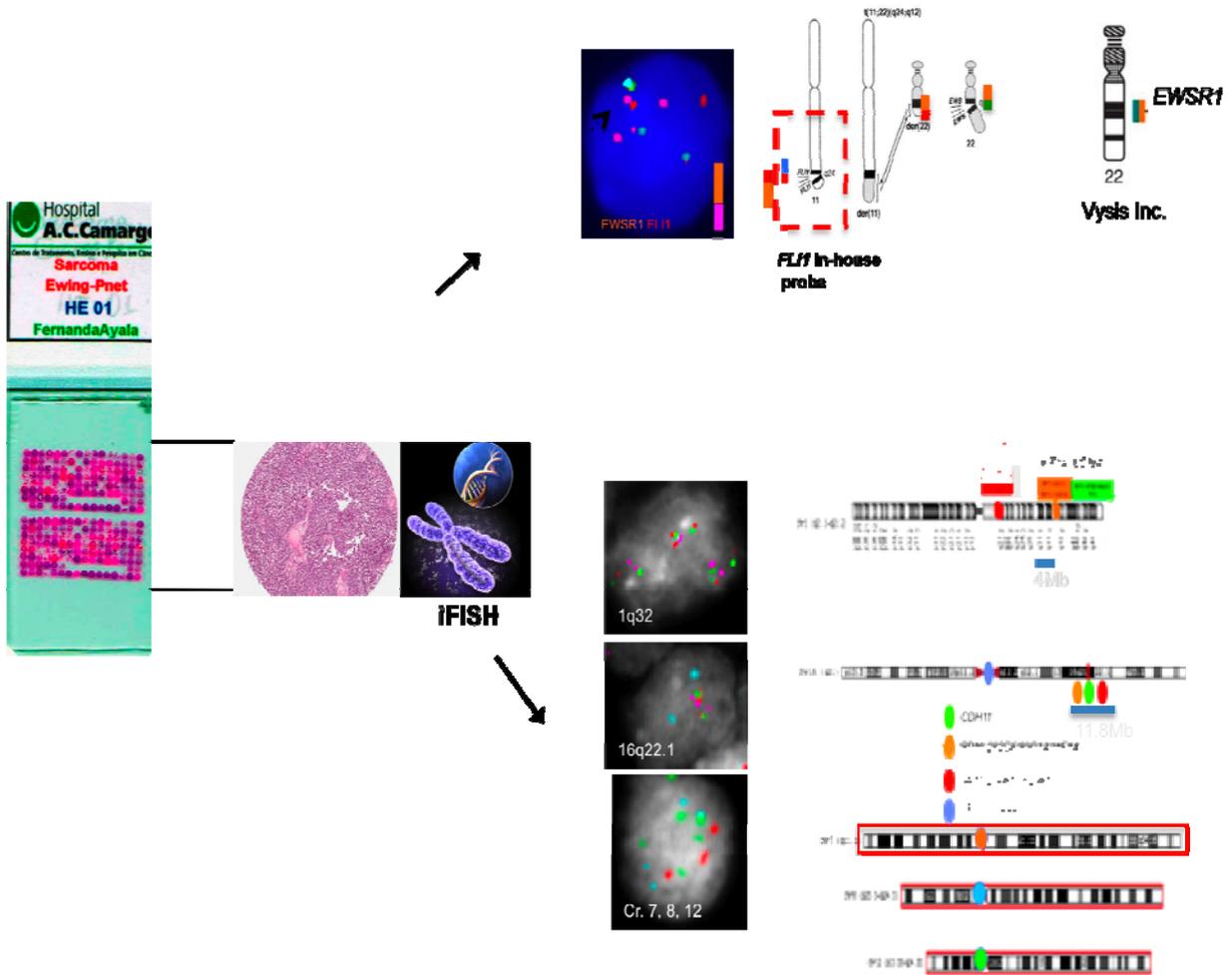


Legenda: Representação de metáfase FISH de linfócitos de sangue normal para a validação da região locus-específico RP11-135L12/RP11- 22903/RP11- 316K24 (verde) (*CDH11*), ainda, para a mesma região, servindo como sondas-controle, as BACs RP11-266K10/RP11-529K1 (rosa) e RP11-262G6/RP11-89O14/RP11-11E14 (laranja) (16q22), localizadas, respectivamente, nas regiões anterior e posterior ao gene de interesse, *CDH11*. Juntamente com a sonda comercial centromérica (DNA alfa-satélite) (Abbott Molecular – Vysis) para o cromossomo 16 (aqua).

Figura 8 - Validação da região locus-específico das sondas caseiras de BAC por metáfase FISH da região 16q21.

Tabela 1 - Descrição dos clones de BAC e sondas comerciais utilizados neste estudo.

Cromossomos	Clone BAC	Tipo de Sonda	Spectrum (cor)	Tamanho (Mbp)	Objetivo da reação de iFISH	Genes Candidatos
11q24	RP11-2207A1 RP11-2126E12	caseira	Vermelho Aqua	1.61 0.817	Fusão	FLI1 (5' e 3' primers)
22q12	-	<i>EWSR1</i> (Vysis)	Laranja Verde	~0.5 ~1.1	<i>Break-Apart</i>	EWSR1 (5' e 3' primers)
1q21.1-21.2	RP11-196G18 RP11-541H15	caseira	Vermelho	~1,98	Ganho/amplificação	<i>FCGR1A</i> <i>VPS45</i>
1q32.1 (~4.2Mbp)	RP11- 92G12 RP11-97B14 RP11-433N15	caseira	Verde Vermelho	1.63 1.74 1.97	Ganho/amplificação	KIF14,DDX59 MDM4,PIK3C2B
16q21-16q22 (~11.8Mbp)	RP11-135L12 RP11-22903 RP11-316K24	caseira	Verde	1.97 1.53 1.56	Hemizigose/ Homozigose (Deleção)	CDH11
	RP11-266K10 RP11-529K1		Vermelho	1.66 1.96		<i>ST3GAL2,</i> <i>COG4,AARS,DDX19A,SF3B,</i> <i>GOT2, FUK</i>
	RP11-262G6 RP11-89O14 RP11-11E14		Laranja	1.61 1.76 1.56		<i>SLC38A7,GOT2</i>
1p11.1-q11.1	-	D1Z5(Vysis)	Laranja	-	Aneuploidia	-
7p11.1-q11.1	-	D7Z1(Vysis)	Verde	-	Aneuploidia	-
8p11.1-p11.1	-	D8Z2(Vysis)	Aqua	-	Aneuploidia	-
12p11.1-p11.1	-	D12Z3(Vysis)	Laranja	-	Aneuploidia	-
16p11.1-q11.1	-	D16Z3(Vysis)	Aqua	-	Aneuploidia	-



Legenda - Confeção da sonda caseira de fusão *EWSR1-FLI1*. Para o gene *FLI1*, usou-se a marcação com as cores aqua-azul e vermelha (visualização em rosa) e para o gene *EWS*, usou-se a sonda pré-marcada com cores verdes e laranja (Vysis Inc.) para a região *EWSR1*. Aplicação da reação de interfase FISH no TMA com as sondas caseira para as regiões 1q321 e 16q21 e, também com as sondas comerciais para análise dos cromossomos inteiros 7, 8 e 12.

Figura 9 - Representação esquemática da estratégia das reações de iFISH realizadas neste estudo.

- **Hibridização *in situ* fluorescente metafásica (mFISH) e interfásica (iFISH)**

As reações de mFISH foram realizadas para o controle das sondas caseiras em lâminas contendo metáfases de linfócitos de amostras de sangue normal.

Já as reações de iFISH foram realizadas em corte do bloco de TMA contendo áreas representativas das neoplasias (108 casos) e em cortes de parafinas colocados em lâminas individuais (24 casos). Portanto, além da lâmina de TMA, 12 lâminas contendo 24 cortes histológicos (2-3 tecidos em cada lâmina) de amostras tumorais fixadas em formalina e emblocadas em parafina que não foram incluídas no TMA pela pouca quantidade do material tumoral, também sofreram hibridação pelas sondas citadas anteriormente.

Para todas as reações de iFISH realizadas, um tecido de placenta normal, presente no TMA, foi utilizado como controle da sensibilidade e especificidade de cada reação. Resumidamente, ambas as reações seguiram os protocolos descritos nos Anexos 7 e 8.

- **Pré-tratamento das lâminas para iFISH e mFISH**

Para a técnica de mFISH, as lâminas contendo metáfase de linfócitos de sangue normal foram colocadas em solução de 2xSSC (pH 7.0) a 37°C durante 30 minutos e transferidas para uma série de desidratação em etanol: 70%, 90% e 100% em temperatura ambiente por 2 minutos cada. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à desnaturação do DNA em uma solução de 70% formamida/2xSSC (pH 7.0) durante 2 minutos e

novamente transferidas para a mesma série de desidratação em etanol. Em seguida, as lâminas foram colocadas por 2 minutos a uma temperatura de -20°C para impedir o reanelamento das fitas de DNA. Após esse procedimento, as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C para secagem até a aplicação da sonda. Para a técnica de iFISH, as lâminas com material tumoral foram desparafinizadas a 56°C por 12 horas antes de serem imersas em 3 soluções de xilol, e desidratadas em um série de 2 etanóis 100% em temperatura ambiente por 10 minutos cada. Depois disso, com a utilização do aparelho de microondas (Citizen, 920W), as lâminas foram tratadas com citrado de sódio (10mM) por entremitentes intervalos de 15 minutos (intervalos de 5 minutos em temperatura ambiente) e, ao final, foram deixadas em temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, as mesmas foram lavadas com solução 2xSSC por 5 minutos em temperatura ambiente. Então, as lâminas foram tratadas em uma solução pré-aquecida de pepsina (SIGMA, cat# P6887-250 mg) e 0.01 N HCL por 8 minutos e, transferidas para uma nova solução de 2xSSC a 37°C, com subsequente desidratação na seguinte série de etanois: 70%, 90% e 100% em temperatura ambiente por 2 minutos cada. Enfim, elas foram deixadas a temperatura ambiente até o momento da aplicação da sonda.

- **Preparo da sonda e incubação**

As sondas foram pré-aquecidas à temperatura ambiente por 5 minutos e submetidas a um pulso de centrifugação. Para a preparação da mistura das sondas caseiras, utilizou-se uma quantidade de 4ul de cada

uma, diferentemente das sondas comerciais onde se aplicou o protocolo recomendado pelo fornecedor, porém, ambas as sondas foram misturadas em um único tubo, quando hibridadas de uma só vez, e homogeneizada em solução tampão de hibridação (LSI/WCP hybridization buffer, Abbott Molecular, Canadá), até completar aproximadamente 10µl -20 µl da mistura. Uma vez o *cocktail* de sondas pronto (sondas e *hybridization buffer*-LSI/WCP hybridization buffer, Abbott Molecular, Canadá) foi submetido a um pulso de centrifugação, desnaturado a 75°C por 5 minutos e mantido a -20°C, até o momento do uso. Em seguida, 10µl -20 µl da mistura foram colocados sobre as lâminas com material tumoral e essas recobertas por lamínulas de 24x50 mm (Fisher Scientific), vedadas com cimento de borracha. Posteriormente, as mesmas foram pré-aquecidas em microondas por 70 segundos (Citizen, 920W), a fim de promover a quebra das ligações entre as proteínas, e aumentando assim a eficiência da hidridação (KO et al. 2001; BROWN, 2007; SUGIMURA 2008, WEISE, 2009). Finalmente, as lâminas de TMA ou as individuais foram incubadas em câmara úmida e escura (Thermobrite, Vysis – Abbott Laboratories), onde foi feita a co-desnaturação a 80°C por 10 minutos e, em seguida, a hibridação propriamente dita, por 18-24 horas a 37°C. Em relação às lâminas com metáfase de linfócitos normais, após a aplicação das sondas marcadas, essas foram diretamente colocadas na câmara úmida programada para 1 minuto de desnaturação a 80°C, seguido da hibridação por no mínimo 18 horas a 37°C.

- **Lavagem pós-hibridação**

Todas as lâminas do estudo, tanto aquelas submetidas à mFISH, quanto as submetidas à iFISH seguiram o mesmo protocolo de lavagem pós-hibridação.

Após o mínimo de 18 horas de incubação da hidridação *in situ*, as lamínulas de plástico que cobriam as lâminas foram retiradas com o auxílio de uma pinça, e, então, as mesmas foram lavadas em solução pré-aquecida de 2xSSC/0.3%NP40, 72°C por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram transferidas para 2xSSC à temperatura ambiente por 5 minutos e desidratadas em uma série gradual de etanois constituídos de 70%, 90% e 100% em temperatura ambiente por 2 minutos cada. Enfim, elas foram deixadas à temperatura ambiente para secagem e contra-coloração com solução *antifade* de DAPI II (4',6-diamidino-2-phenylindole, Vectashield®). Assim, as lâminas hibridadas foram estocadas no mínimo 30 minutos em -20°C, antes da análise em microscópio de epifluorescência.

- **Crítérios de Análise Citogenética Molecular por FISH Interfásico**

Análises de amostras de FFEP tumorais de tumores de Ewing – iFISH

As análises de multicolor interfase FISH foram realizadas utilizando o microscópio de fluorescência Zeiss Axio Imager M.1®, com uma câmera digital, AxioCam MRm, acoplada. Equipado por um programa de computador AxioVision 4.3 (Carl Zeiss Canada Ltd, Canadá), e com uma luz ultravioleta (HBO 100) por epi-iluminação. As análises foram realizadas utilizando a objetiva Plan-Apochromat de imersão a óleo - 63x/1.4, e com os seguintes

filtros simples: DAPI, fluoresceína isotiocianato (FITC), SPOrange, Texas Red, Aqua (Chroma Technology Corp., Bellowa Falls, USA). O filtro triplo estava presente (Chroma Technology, Bellowa Falls, USA) para simultânea visualização das três cores: azul-DAPI, verde e vermelho.

O estudo foi realizado em lâminas de boa qualidade e com hibridação *in situ* superior a 70% (Taylor et al., 1994). Para cada sonda empregada foram utilizados os seguintes critérios para avaliação: (1) 100 núcleos interfásicos intactos, não sobrepostos uns aos outros ou truncados; (2) sinais fluorescentes de intensidade equivalente e completamente separados.

Casos com ausência ou escassez de tumor (menos 50%), ou com células inviáveis para FISH (devido a artefatos pré-analíticos como o tipo e tempo de fixação do material tumoral), foram considerados não aplicáveis (não informativos) para FISH e excluídos das análises. A proximidade entre os sinais foi verificada considerando o espaço entre eles, ou seja, quando o diâmetro era igual a um sinal, correspondeu a um único sinal, no entanto, quando separados por mais de dois sinais de diâmetro, foram considerados dois sinais distintos (DRACOPOLI 2001, 2005; VARELLA-GARCIA et al. 2009). O critério utilizado para estabelecer o valor do ponto de corte (do inglês, *cut-off*) das análises foi feito através da seguinte fórmula matemática: média + 2*Desvio Padrão, através de 10 casos controles presentes no TMA (WYANDT et al. 1998, AMIEL et al. 2003) para ganho e, média + 3*Desvio Padrão (MEZZELANI et al. 1999; KAWAI et al. 2004; KORSHUNOVA et al. 2005; VENTURA et al. 2006) para deleção. As amostras classificadas como

casos normais usadas para definir o valor do *cuf-off* serão mostradas juntamente com o resultados.

Para todas as análises das reações de multicolor iFISH, as imagens digitais das lâminas contendo os casos do estudo e coradas com Hematoxilina-Eosina, foram escaneadas pelo aparelho Aperio CS Scanner (Aperio Technologies, Vista, CA, USA). Cada lâmina foi escaneada com magnitude de 20x, e utilizada para visualizar a região tumoral de cada paciente durante as análises de iFISH (WebScope, Aperio, Vista, CA, USA), assegurando que as análises do número de cópias gênicas fossem feitas somente em núcleos de células tumorais.

A captura e o processamento das imagem digitais foram realizados usando o *software* ISIS (MetaSystems, Altussheim, Germany). A aquisição das imagens foi feita pela função “focus Z-stack” (KOSYAKOVA et al. 2009). Essa função permite a captura dos sinais em vários cortes sequenciais (paralelos ao eixo “x”), com a distância entre eles pré-definida manualmente (5 cortes com distância de 0.5 μm entre eles). Através dessa função os sinais presentes em diferentes camadas do corte histológico são detectados, evitando que artefatos mascarem os sinais das sondas. Ao final, essa imagem é combinada, mostrando o melhor foco de cada sonda, e com os sinais inespecíficos removidos.

Critérios para confirmação citogenética molecular da fusão *EWSR1/FLI1* e/ou quebra do gene *EWS*

A técnica de iFISH multicolorido foi realizado para avaliação do rearranjo entre os cromossomos (11; 22) (q24;q12), empregando a sonda comercial de quebra para a região *EWSR1* (Vysis), e duas sondas BAC flanqueando as extremidades 3' and 5' do gene *FLI1*. O tecido normal de placenta foi usado como controle negativo, para verificar os padrões falso-negativos dos genes. Enquanto que a linhagem celular de Ewing Sarcoma, Hs 822T (ATCC, Manassas, VA), foi usada como controle positivo do rearranjo do gene *EWS* e para garantir uma análise robusta através de um sistema de escore reprodutível dessa translocação em tumores de Ewing. Para definir a translocação do gene *EWS*, o *cut-off* usado foi o de 5% de células alteradas geneticamente, com sinais distantes duas ou três vezes o diâmetro estimado de um sinal; já para a fusão *EWSR1-FLI1*, ela foi considerada presente quando a co-localização entre os genes 5'*EWSR1* e 3'*FLI1* foi vista em mais de 15% das células tumorais (VENTURA et al. 2006). Por fim, o escore foi classificado pela presença ou ausência de fusão com o gene *FLI1*, ou pela quebra do gene *EWS*.

Critérios para identificação do número de cópias dos genes no locus 1q32.1

Para avaliar o número de cópias dos genes *KIF14/DDX59* e *MDM4/PI3KC2 β* , foi definido como ganho quando três ou mais sinais por núcleo interfásico eram vistos e, com simultânea presença de sinais

centroméricos intactos, ocorrendo em mais de 5% dos núcleos. E, células com dissomia, ou seja, células com duas cópias de cada alelo dos genes serviram como controles interno negativos.

Critérios para identificação do número de cópias gênicas dos loci 16q21-22

Para a análise do gene *CDH11* (caderina osteoblástica), consideramos tanto a deleção quanto o ganho desta região. A deleção foi vista quando ocorreu a perda de uma ou de duas cópia do gene *CDH11*, mas com a presença intacta dos sinais centroméricos vistos no núcleo. Assim, através de análises de casos considerados normais usados como controles presentes na lâmina de TMA (casos sem alteração no número de cópias), as alterações numéricas do gene *CDH11* foram definidas da seguinte forma: **1)** deleção por hemizigose - presença de apenas uma cópia do gene *CDH11* e sonda centromérica do cromossomo (CEP) 16 intacta, em mais de 30% dos núcleos tumorais; **2)** considerou-se deleção por homozigose quando a ausência das duas cópias do gene *CDH11* com a sonda CEP 16 intacta estava presente em mais de 40% dos núcleos tumorais (KORSHUNOV et al. 2005; ABOU YOUSSEF et al. 2011); **3)** Já o ganho dessa região foi definido com a presença de mais de 2 sinais do gene *CDH11* e com a sonda CEP 16 intacta, em mais de 5% das células tumorais. Semelhante às análises da região 1q32.1, núcleos com menos de 2 sinais (monossomia do gene) fluorescentes, em menos de 10% das células tumorais, não foram incluídos na contagem final, sendo considerados

artefatos teciduais. E, células com dissomia, ou seja, células com duas cópias de cada alelo dos genes serviram como controles interno negativos.

Critérios para identificação das alterações cromossômicas secundárias dos cromossomos 7, 8 e 12

As alterações secundárias ou aneussomias dos cromossomos 7, 8 e 12 foram assim consideradas quando o número de cópias cromossômicas (sondas centroméricas) foi maior do que duas cópias dos seus alelos presente no núcleo das células tumorais.

Para todas as análises de enumeração do número de cópias gênicas, os pontos de corte aplicados neste estudo levaram em consideração: artefatos teciduais, células truncadas, tamanho da célula, condensação da cromatina e aneuploidia.

- **Grau de Ploidia**

A formação de altas taxas de ploidia é um evento raro em tumores de Ewing quando comparado com outros tumores pediátricos, como o neuroblastoma. Cerca de 12% de ploidia alta é encontrado nos casos de pacientes com tumores de Ewing (BETTS et al. 2005). Segundos alguns autores, pacientes que apresentam ploidia acima de 50 cromossomos ou um cariótipo mais complexo independente de metástases ao diagnóstico são associados a pior sobrevida global (ROBERTS et al. 2008). No presente estudo, a classificação da ploidia pela iFISH foi feita de acordo com os seguintes critérios adaptados de ROSSI et al. (2005): **1)** diploidia, >50% das

células mostrando dois sinais para todas as sondas; **2)** triploidia, >20% das células mostrando três sinais para pelo menos duas sondas; **3)** tetraploidia, >20% das células mostrando quatro sinais para pelo menos duas sondas; **4)** poliploidia, >50% das células mostrando mais de quatro sinais para pelo menos duas sondas.

As divergências de pontuação quanto a enumeração das alterações gênicas foram verificadas, independentemente, por uma outra pesquisadora (MY, Queens' University), para todas as regiões alvos analisadas.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Através de análises estatísticas foram avaliadas as associações entre as alterações cromossômicas e as características clínico-patológicas dos pacientes deste estudo. As alterações do número de cópias gênicas foram avaliadas em relação aos ganhos ou perdas dos genes e dos cromossomos inteiros. A alteração estrutural entre os genes *EWS/FLI1* foi classificada como presente ou ausente para a fusão. Os parâmetros incluídos nas análises foram: extensão da doença ao diagnóstico (localizada x disseminada), sítio tumoral (ósseo x extraósseo), idade (≤ 15 anos x > 15 anos), gênero (femino x masculino), sítio da metástase ao diagnóstico (pulmonar x não pulmonar), recorrência tumoral, ganhos do cromossomo inteiro 7, 8 e 12, ganhos da região 1q32.1 e ganhos e perdas da região 16q21-16q22.1. O cálculo da estimativa de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de evento (SLE) foram feitos de acordo com o método de

Kaplan – Meier (Kaplan-Meier, 1958), para cada grupo estudado. E, as comparações entre as curvas de sobrevida foram feitas usando o teste de *Log-rank*. A duração da SLE foi computada entre a data do diagnóstico de TE e a data da primeira recorrência da doença, definido como recorrência local, sistêmica ou morte. Pacientes que a doença não recorreu, o tempo foi censurado na data de seu último contato. Portanto, para as análises de SLE, foram excluídos pacientes com metástases ao diagnóstico (Estádio IV) e com doença residual clinicamente detectável após o tratamento do tumor primário.

Já para as análises de SG, somente morte foi considerado um evento. O seguimento clínico foi acompanhado até Janeiro de 2009. Estimativas de SG e SLE de 5 anos foram dadas juntamente com os seus 95% intervalo de confiança acordo com DOREY e KORN (1987). Para a análise de comparação entre os parâmetros clínicos e genéticos como: número de cópias dos genes, metástases e recorrência tumoral, utilizou-se o teste de qui-quadrado ou o teste exato de *Fisher*. O teste de *Mann-Whitney* foi usado para determinar parâmetros quantitativos entre os grupos do estudo. Uma seleção passo a passo foi usada para identificar os preditores mais importante entre os parâmetros genéticos e, para isso, todas as características clínicas foram incluídas nos modelos estatísticos. A influência independente dos fatores genéticos e clínicos na sobrevida global e livre de evento foi estimada usando o modelo de proporcional de risco do Cox.

Os dados obtidos decorrentes das análises de citogenética molecular foram colocados em tabelas de *Excel*, e a análise estatística foi realizada

utilizando o programa estatístico SPSS para Macintosh (Apple Inc.), versão 13.0, SPSS Inc. As análises de sobrevidas foram avaliadas com o programa estatístico GraphPad Prism Statistical version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Todas as análises foram realizadas na população total, assim como no grupo de pacientes com doença localizada. O nível de significância estabelecido foi alfa <0.05.

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS

A caracterização das amostras do estudo foram obtidas no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Hospital A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente e está resumida na Tabela 2. Essa foi uma casuística pertencente a um estudo de coorte retrospectivo entre 1975 e 2008 que resultou em uma amostra consistente para realizar os testes estatísticos para as análises feitas neste trabalho.

Tabela 2- Características clínico-patológicas dos 132 pacientes com tumores de Ewing do estudo.

<i>Variáveis</i>	<i>Categorias</i>	<i>Pacientes N(%)</i>
Gênero	Masculino	79 (59.8)
	Feminino	53 (40.2)
Idade (0.25-52 anos)	≤15	73 (55.3)
	>15	59 (44.7)
Tumor primário	Ósseo	121 (91.7)
	Extra Ósseo	11 (8.3)
Sítio do tumor primário	Extremidade inferior	61 (46.2)
	Pelvis	30 (22.7)
	Extremidade superior	27 (20.5)
	Tórax	13 (9.8)
	Outros	1(0.8)
Status da doença ao diagnóstico	Localizada	95 (72.0)
	Metastática	37 (28.0)
Duração dos sintomas (0.17-60 meses)	Dor local	39(22.0)
	Tumoração	11 (8.3)
	Dor+tumoração	59 (44.7)
	Outros	15(18.9)
	Ignorado	8(6.1)
Tratamento	Tratado	102(78.5)
	Não tratado	28 (21.5)
	Ignorado	2(1.5)
Recaída tumoral	Sim	67 (50.8)
	Não	64 (48.5)
	Ignorado	1 (0.8)
Seguimento	Vivo sem doença	34 (25.8)
	Vivo com doença	17 (12.9)
	Morte devido a doença	80 (60.6)
	Ignorado	1 (0.8)

4.2 REAÇÃO DE HIDRIDAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA- iFISH

A reação de multicolor interfase FISH (iFISH) foi realizada em cortes do bloco de TMA e em 12 lâminas individuais contendo cortes histológicos de áreas representativas das neoplasias, totalizando 132 pacientes. Para cada análise foram contadas 100 núcleos interfásicos não sobrepostos de cada paciente. Resumidamente, o número de cópias gênicas foi analisado nas regiões das seguintes alterações cromossômicas: t(11;22), 1q32.1, 16q21-q22 e aberrações no número de cópias dos cromossomos 7, 8 e 12. Quanto às aneuploidias, foram analisadas de acordo com o número de cópias extras dos cromossomos correspondentes à região de interesse, enquanto que a ploidia seguiu os critérios de Rossi et al. (2005), descritos anteriormente. Portanto, essas alterações genéticas foram analisadas de forma quantitativa (contagem de sinais fluorescentes) e arquivadas em planilhas de Excel, com a posterior aplicação de testes estatísticos entre o número de cópias gênicas e as características clínico-patológicas e sobrevida dos pacientes, a fim de encontrar potenciais fatores prognósticos para TE.

4.2.1 Análise das Alterações Genéticas

- **Fusão dos Genes *EWS-FLI1* [t(11;22) (q24;q12)]**

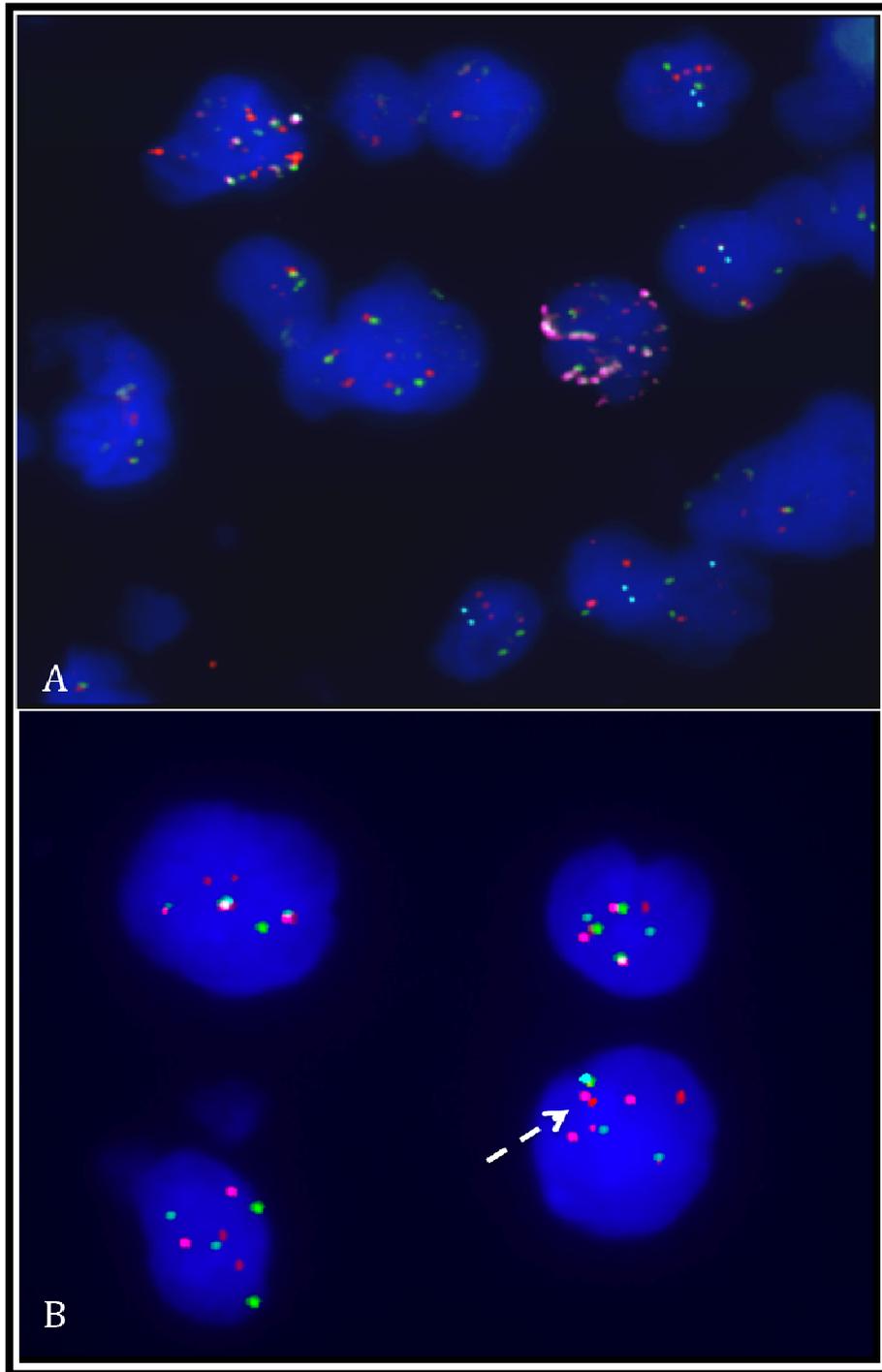
A fusão dos genes *EWSR1-FLI1* foi verificada através da técnica de iFISH multicolorida, usando cores distintas para representar as porções 5' e

3' dos seus respectivos genes - *EWSR1-FLI1*. Para a o gene *EWS*, foi-se usada a sonda comercial pré marcada com cores laranja para a porção 5', e em verde para a porção 3'. Já para o gene *FLI1*, foi-se usada sonda caseira com marcação vermelha para a região 3', e a outra porção 5' com a cor aqua (azul). Desta forma, esta análise objetivou verificar a quebra do gene *EWS* (cor laranja-*dUTP* separada da cor verde-*dUTP* - Vysis) e a fusão das porções 5'*EWSR1*- 3'*FLI1* (colocalização das cores laranja-*dUTP* e vermelho-*dUTP*) dos genes. Ao final, a análise foi classificada pela presença ou ausência de tais alterações genéticas, seguindo os critério de VARELLA-GARCIA et al. (2006), para fusão e quebra gênica. Vale ressaltar que a cor vermelha é visualizada como cor rosa pela fotomicrografia produzida pelo programa de computador (ISIS Metasystems).

Dos 132 casos do estudo, 129 (97.8%) foram avaliáveis, dos quais 121/129 (93.8%) pacientes apresentaram a alteração genética clássica - translocação ou fusão com o gene *FLI1* - dos tumores de Ewing. Enquanto que, oito (6.2%) pacientes apresentaram somente a quebra do gene *EWSR1*, ou seja, sugerindo outros rearranjos desse gene. Três casos foram altamente positivos para a imunoexpressão difusa da proteína CD99, somente. Ganhos ou ampliações dos genes *EWSR1* e/ou *FLI1* foram observados em 16/129 e 5/129 casos avaliados, respectivamente. Vale notar que, o controle negativo (placenta) também apresentou ganho em ambos os genes. Ademais, não houve associação estatística entre as análises de citogenética molecular de rerranjos do gene *EWSR1* e de imunoistoquímica contra os anticorpos CD99 e FLI1. No entanto, 97.5% dos tumores dos

pacientes de Ewing com marcação positiva difusa para o anticorpo CD99, também apresentaram fusão dos genes *EWSR1-FLI1*.

A Figura 10 representa os tipos de alterações genéticas encontradas para os genes *EWS* e *FLI1*.



Legenda: Fotomicrografia das alterações genéticas em *EWSR1/FLI1* pela técnica de iFISH. Cada gene está hibridado com 2 sondas. Para o gene EWS, as cores verde e laranja (pré marcardas pela Vysis), e para o gene FLI1, as cores rosa e azul (sonda caseira). A) Representação de quebra do gene *EWS* e ganho do número de cópias do gene *FLI-1*, sinais verde e laranja separados, indicando a quebra do gene *EWS*. 63x; B) Representação da fusão gênica *EWSR1-FLI1* (seta), sinais laranja e rosa juntos, menos de um sinal de distância, 100x. Núcleos corados com DAPI.

Figura 10 - Reação de iFISH para análise de quebra do gene *EWS* e fusão *EWSR1-FLI1* em células de tumores de Ewing.

Ganho da Região 1q32.1

A alteração genética dessa região foi analisada por uma reação de iFISH com três cores diferentes de sinais fluorescentes usando sondas caseiras de BAC. Os clones usados cobriram as regiões dos genes *KIF14/DDX59* (RP11-92G12/RP11-143F20, marcados com *verde-dUTP*) e para a identificação dos genes *MDM4/PI3KC2 β* (RP11-97B14/RP11-433N15, marcados com *vermelho-dUTP*). Uma sonda comercial (Vysis, *laranja-dUTP*) foi usada para a marcação da região centromérica do cromossomo 1. Dentre os 128 casos avaliáveis, sete casos não puderam ser analisados, sendo classificados como “não informativos” devido à intensidade inadequada dos sinais fluorescentes, ausência/escassez de tumor em menos de 50% das células, ou com células inviáveis (DNA não intacto) para FISH.

Para as análises do número alterado de cópias gênicas em 121 casos, utilizamos o *cut-off* para ganho calculado em 10 casos com alta porcentagem de células normais (VARELLA-GARCIA et al. 2009) (Tabela 3). O cálculo para estabelecer esse *cut-off* foi baseado na seguinte fórmula matemática:

Média (número de núcleos com ganhos da região) + 2* Desvio Padrão.
--

Tabela 3 - Representação das dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de ganho de cópias gênicas.

Amostras de TE	Número de alterações gênicas em cada amostra	
	Normal	Ganho (1q32.1)
TE7	97	1
TE9	98	1
TE11	93	3
TE23	96	3
TE125	95	4
TE113	92	4
TE60	96	4
TE61	91	3
TE68	96	1
TE75	97	1

Tabela 3.1 - Cálculo matemático para limites de ganho dos genes da região 1q32.1.

Cálculo matemático	Valor
Média (Núcleo com ganho)	2.5
2*Desvio Padrão	2.708
<i>Cut-off</i> para ganho	5.208

As amostras representavam ganho dessa região quando se via mais de duas cópias de cada gene em mais de 5 núcleos e, assim, classificadas - “ganho de região 1q32.1” -, juntamente com número de cópias intactas do cromossomo 1. Aquelas amostras com número de cópias gênicas superior a 10 cópias de cada locus, consideramos “amplificada” (Bayani, 2004). Porém, não houve amplificação dos genes dessa região nas amostras de tumores de Ewing aqui estudadas. E, células com dissomia dentro de uma mesma amostra serviram como controles interno negativos.

Assim, ganhos da região **1q32.1** de, aproximadamente 4Mpb, foram considerados em 15/128 (11.7%) casos, os quais foram classificados da seguinte forma: **1)** Ganhos de ambos os loci dos genes da região 1q32.1 com o CEP1 intacto foram vistos em 6 (4.7%) casos, em mais de 5% das células tumorais; **2)** Ganhos somente dos genes (*KIF14/DDX59*) foram vistos em 3 (2.3%) casos, com o sinais de CEP1 e com os sinais dos genes *MDM4/PI3KC2 β* intactos, em mais de 5% das células. Interessante ressaltar que um caso apresentando metástase pulmonar mostrou ganho de *KIF14/DDX59* em 29% das células tumorais, confirmando dados que apresentam KIF14 altamente expresso em tecido pulmonar (Corson et al. 2005); **3)** Ganhos somente dos loci dos genes (*MDM4/PI3KC2 β*), com os sinais de CEP1 e *KIF14/DDX59* intactos, foram encontrados em 6 (4.7%) casos em mais de 5% das células tumorais; **4)** Seis (4.7%) casos apresentaram cópias extras do cromossomo 1 (3-5 sinais), acompanhando ganhos da região 1q32.1, representando casos de polissomia em mais de 15% das células tumorais (AMIEL et al. 2003); **5)** Dentre os 4 casos pareados (primário + recaída), somente 1 caso (tumor primário) apresentou ganho da região 1q32.1.

Na maioria das vezes, as células tumorais mostraram aumento do número de cópias dos genes, variando entre três e sete sinais (ganho), enquanto o centrômero do cromossomo 1 (CEP1) era diplóide. O número de sinais do locus de *KIF14/DDX59*, geralmente, apresentou menos número de cópias gênicas alteradas (3-5 sinais) do que o locus de *MDM4/PI3KC2 β* (3-7 sinais). Ainda, a sonda dos genes *MDM4/PI3KC2 β* era mais frequente entre

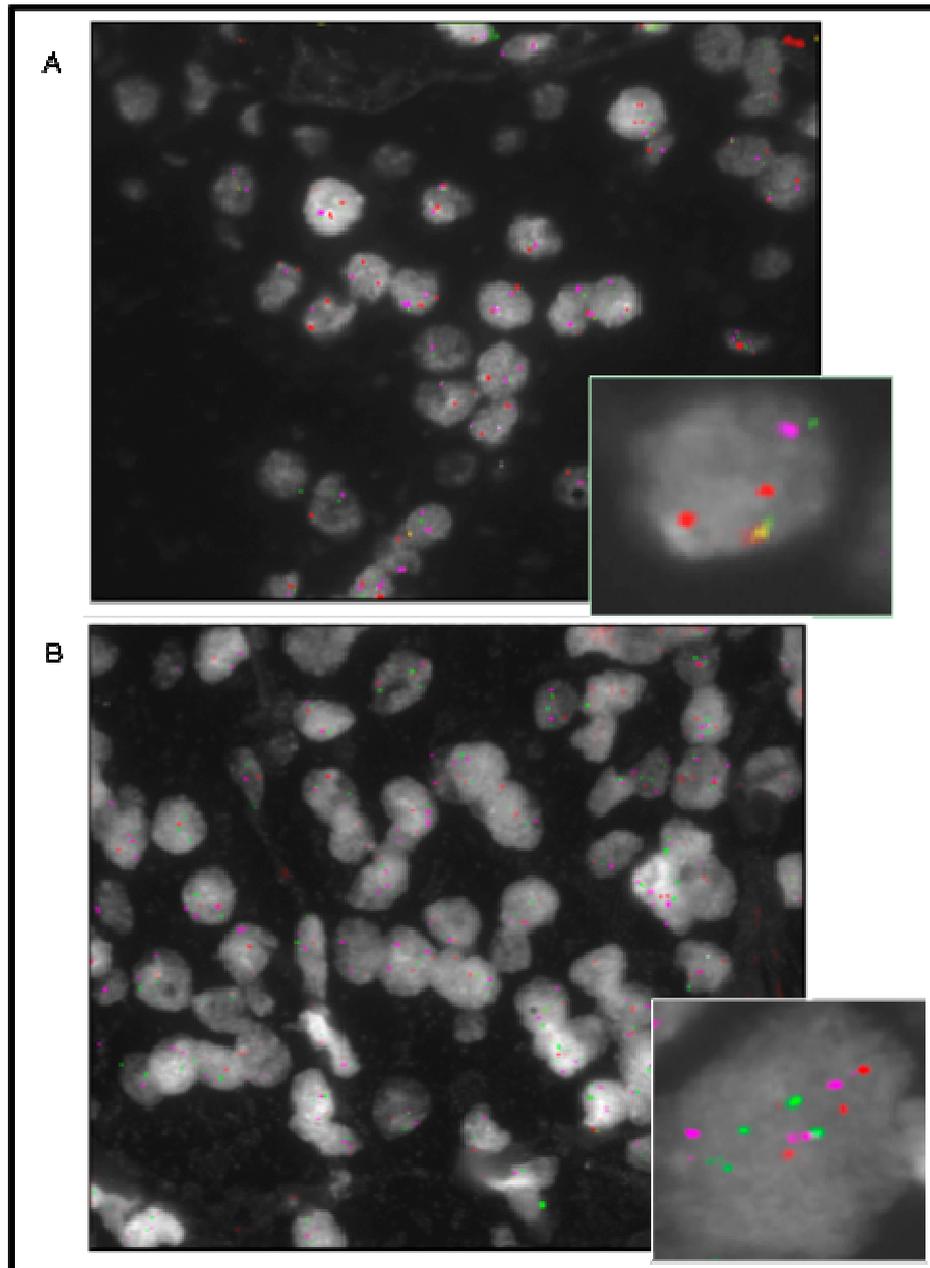
as amostras com alteração genética. O número de cópias visto com menos de 2 sinais (monossomia do gene), em menos de 10% das células tumorais nas amostras do estudo, não foram incluídas na contagem final, sendo considerado artefatos teciduais. Para fins estatísticos, os casos com polissomia do cromossomo 1 foram excluídos das análises.

Os resultados do escore estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequência de amostras com alterações no número de cópias gênicas em 1q32.1, em 128 pacientes avaliáveis.

Alteração no número de cópias	Frequência de amostras com alterações genéticas N(%)			
	<i>KIF14</i> (>3)	<i>MDM4</i> (>3)	<i>KIF14/MDM4/CEP1</i> (>3/>3/2)	<i>KIF14/MDM4/CEP1</i> (>3/>3/>3)
Ganho	3 (2.3)	6 (4.7)	6(4.7)	-
Polissomia	-	-	-	6 (4.7)

A Figura 11 representa os tipos de alterações genéticas encontradas para esses genes.



Legenda: Fotomicrografia das alterações genéticas em **1q32.1** pela técnica de iFISH. Os genes estão hibridados com as seguintes sondas: *KIF14/DDX59* (verde), *MDM4/PIK3C2 β* (pink) e CEP (1) - laranja. **A)** Imagem representando ausência de alteração genética para essa região. Vê-se dois sinais intactos para cada cor de sonda, 63x; **B)** Representação do ganho do número de cópias gênicas dos genes - *KIF14/DDX59* e *MDM4/PIK3C2 β* . Vê-se mais de duas cópias de cada cor de sonda identificando ganho dessa região, 63x.

Figura 11 - Análises de multicolor iFISH em tecidos de TE para a região **1q32.1**. O painel mostra imagens em pseudo-DAPI contra-corando núcleos do tumor em cinza para facilitar a interpretação. 63x.

- **ANÁLISE DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS – DELEÇÃO E GANHO DA REGIÃO 16q21-q22.1**

Para esta região, foi feita uma reação de iFISH com quatro cores distintas de sinais fluorescentes usando sondas caseiras de BAC. Os clones usados cobriram as regiões do gene-alvo, *CDH11* (RP11-135L12/RP11-22903/RP11-316K24, marcados com verde-*dUTP*) ainda, para a mesma região, servindo como sondas-controle de deleção intersticial, os clones de BAC RP11-266K10/RP11-529K1 e RP11-262G6/RP11-89O14/RP11-11E14, marcados com vermelho e laranja – *dUTPs*, localizadas respectivamente, nas regiões anterior e posterior ao gene de interesse, *CDH11*. Além disso, uma sonda comercial (Vysis, *aqua-dUTP*) foi usada para marcação da região centromérica do cromossomo 16. Dezesete dos 132 casos não puderam ser avaliados, sendo então, classificados como “não informativos” devido à intensidade inadequada dos sinais fluorescentes ou ausência/escassez de tumor em menos de 50% das células, ou com células inviáveis (DNA não intacto) para iFISH. Portanto, 115 casos foram analisados. Para as análises do número alterado de cópias gênicas, foi-se utilizado um *cut-off* para ganho calculado pelos 10 casos com alta porcentagem de células normais (VARELLA-GARCIA et al. 2009) (Tabelas 4 e 4.1). O cálculo para estabelecer o ponto de corte foi baseado na seguinte fórmula matemática:

Média (número de núcleos com ganhos da região) + 2* Desvio Padrão.
--

Porém, para o cálculo de deleção do número de cópias gênicas, o cálculo foi modificado para 3* desvio padrão a fim de evitar resultados falso-positivos (Tabelas 5 e 5.1), gerado pela falta de consistência nos resultados devido aos artefatos presentes em amostras de parafina, como células truncadas (núcleos contendo uma cópia do gene que não está deletado). Entretanto, para obter um resultado mais robusto, usamos células tumorais com duas cópias dos genes, dentro de uma mesma amostra, como controles interno negativos.

Tabela 5 - Representação de dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de ganho de cópias gênicas.

Amostras de TE	Número de alterações gênicas em cada amostra	
	Normal	Ganho (16q21)
TE8	98	2
TE17	92	3
TE18	85	4
TE27	75	4
TE129	86	2
TE117	89	3
TE76	98	2
TE90	82	5
TE91	85	2
TE98	96	3

Tabela 5.1 - Cálculo matemático para limites de ganho dos genes da região 16q21-q22.

Cálculo matemático	Valor
Média (Núcleo com ganho)	1.05
2*Desvio Padrão	2.10
<i>Cut-off</i> para ganho	5.1

Tabela 6 - Representação de dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de deleção por hemizigose.

Amostras de TE	Número de alterações gênicas em cada amostra	
	Normal	Deleção/hemizigose (16q21)
TE7	98	2
TE10	92	7
TE11	85	15
TE23	75	16
TE124	86	14
TE112	89	9
TE61	98	2
TE65	82	13
TE69	85	15
TE74	96	4

Tabela 6.1 - Cálculo matemático para limites de deleção/hemizigose dos genes da região 16q21-q22.1.

Cálculo matemático	Valor
Média (Núcleo com deleção/hemizigose)	10.09
3*Desvio Padrão	16.45
<i>Cut-off</i> para deleção	26.6

Desta forma, as análises do número de cópias do gene *CDH11* foram avaliáveis em 115/132 (87.1%) casos. As sondas-controles adjacentes a esse gene foram usadas para aumentar a especificidade das análises e

verificar se há uma deleção intersticial do gene-alvo. Essas sondas-controles compreenderam a região onde residem alguns genes da superfamília das caderinas: *CDH8*, *CDH1*, *CDH3*, *CDH5*, *CDH16*; genes esses que também se encontram envolvidos na tumorigênese de muitos outros tumores (KREMMIDIOTIS et al. 1998; BLASCHKE et al. 2002).

Os resultados obtidos pelas análises de interfase FISH mostraram dois grupos distintos de instabilidade genética, totalizando 24/115 (20.9%) casos. E, o restante foram casos sem alteração no número de cópias do gene *CDH11*. Um grupo apresentou deleção em hemizigose do gene *CDH11* que abrangeu 11/115 (9.6%) casos com presença intacta do cromossomo 16, sendo sete casos de tumores primários, e quatro casos representando recorrência tumoral. Os genes usados como controles (região de outras caderinas, já citadas), também mostraram deleção no número de cópias gênicas, acompanhando a deleção do gene *CDH11*, logo, eliminando deleção do tipo intersticial. Vale destacar que somente um caso de monossomia do cromossomo 16 foi encontrado, sendo este excluído das subsequentes análises estatísticas. Portanto, esses achados nos mostram que ocorre uma macrodeleção, de no mínimo 11.8 Mpb, no braço longo do cromossomo 16.

Contudo, o outro grupo mostrou ganho dessa região em 13/115 (11.3%) pacientes, com a presença intacta do cromossomo 16. Dentre esses, 10 casos eram tumores primários e três recorrências tumorais. Para essa região, pacientes portadores de tumores de Ewing possuem populações distintas quanto ao número de cópias desse gene, variando de 1

a 5 sinais. E, as anormalidades genéticas nesta região mostram um mesmo padrão de alteração - *CDH11* e controles com o mesmo número de cópias alteradas -, mas com sinais do CEP 16 intactos. Portanto, esse padrão indica que, a maior frequência de ganhos ou deleções ocorrem em direção à região telomérica do cromossomo 16.

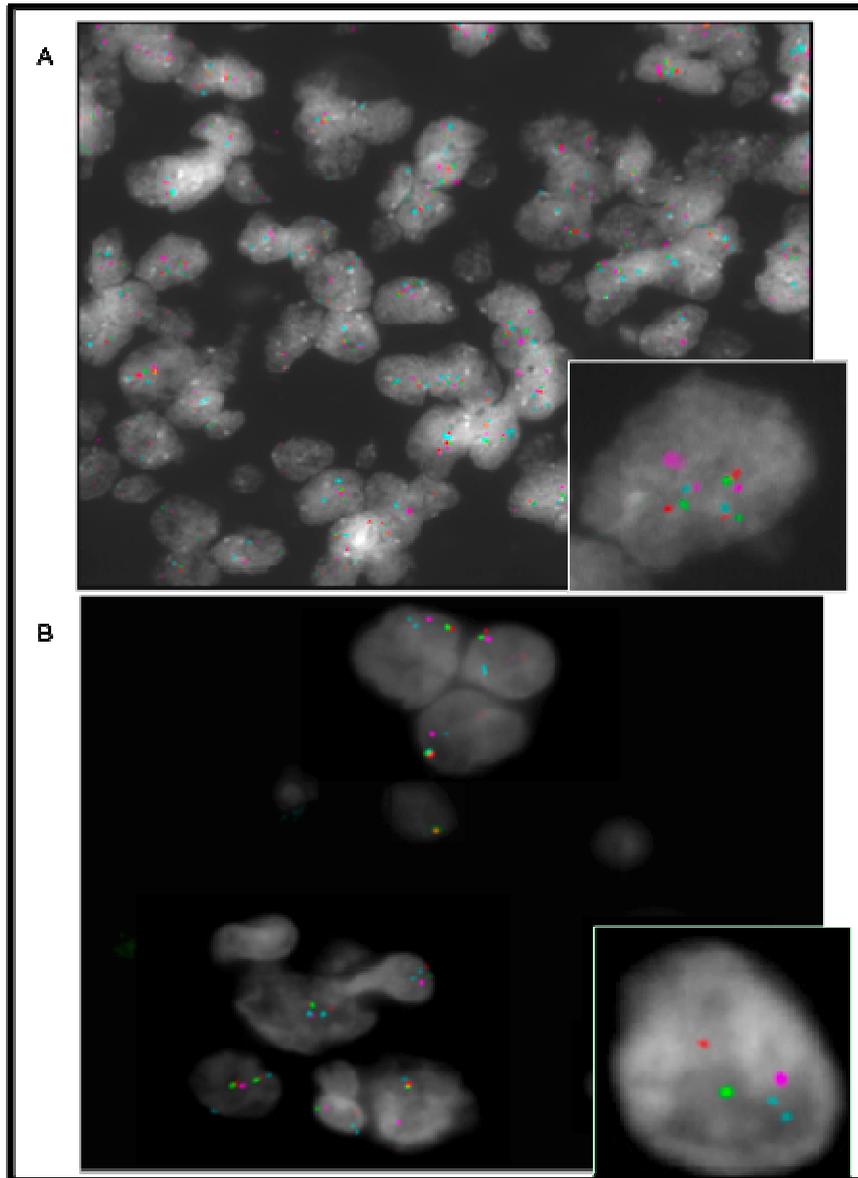
Dentre os casos pareados, 3/4 casos pareados apresentaram diferenças quanto ao número de cópias para essa região. Todos os três casos com anormalidade genética eram recaída tumoral, com um caso apresentando ganho dessa região, enquanto os outros dois casos apresentaram deleção por hemizigose. Nenhum dos casos analisados mostraram deleção por homozigose.

Os resultados do escore estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Frequência de amostras com alterações no número de cópias gênicas na região 16q21-16q22.1 em 115 casos analisados.

Alteração no número de cópias	Frequência de amostras com alterações genéticas	
	N(%)	
	<i>CDH11/CEP16</i>	
Deleção por hemizigose	11 (9.6)	
Deleção por homozigose	0	
Ganho	13 (11.3)	
Total	24 (20.9)	

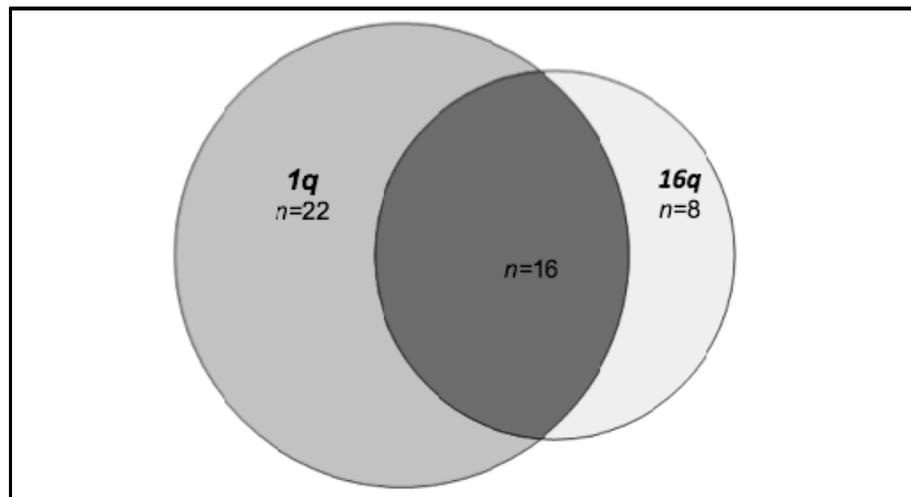
A Figura 12 representa os tipos de alterações genéticas encontradas para essa região.



Legenda: Fotomicrografia das alterações genéticas em **16q21** pela técnica de iFISH. O gene alvo está hibridado com a sonda caseira verde - **CDH11** (verde, BAC), CEP (16) (CEP16, Vysis Inc), cor azul-aqua e as demais cores, *pink*, laranja, usadas como controles (BAC); **A**) Imagem mostrando ganho do número de cópias do gene **CDH11**, em verde, e ganho das sondas controles (*pink* e laranja) adjacentes ao gene-alvo. Vê-se dois sinais intactos do CEP (16), 63x; **B**) Imagem de iFISH mostrando deleção por hemizigose do **CDH11** (verde), assim como deleção dos sinais controles adjacentes. Nota-se os sinais intactos do CEP(16), no detalhe.

Figura 12 - Imagens representativas de iFISH mostrando as alterações genéticas da região **16q21** em tumores de Ewing. O painel mostra imagens em pseudo-DAPI contra-corando núcleos do tumor em cinza para facilitar a interpretação. 63x.

O diagrama de *Venn* mostrado na Figura 13 representa a distribuição e a interrelação entre os ganhos da região 1q21-1q32.1 e deleções em 16q21-q22.1, indicando uma possível interação entre essas duas anormalidades genéticas presente nos tumores de Ewing.



Legenda: O diagrama mostra a interrelação entre as alterações genéticas dos cromossomos 1 e 16. Nesta casuística encontramos 16 casos das regiões 1q interagindo com a região 16q.

Figura 13 - Venn diagrama mostrando a distribuição e a interrelação das alterações genéticas das regiões 1q21-1q32.1 e 16q21 em 46 tumores de Ewing.

- **ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DOS CROMOSSOMOS 7, 8 e 12**

Para o estudo das alterações dos cromossomos 7, 8 e 12, foi feita uma reação de iFISH com três cores distintas de sinais fluorescentes usando sondas comerciais. Para os cromossomos 7, 8 e 12, foram usadas sondas alfa-satélite - CEP(7), CEP(8) e CEP(12) - com marcação respectiva de, cor laranja, cor azul-aqua e cor verde, pré marcadas comercialmente.

Oito casos não puderam ser avaliados, e foram considerados “não informativos”, de acordo com os mesmos critérios citados anteriormente para as outras análises genéticas aqui estudadas. Portanto, a enumeração das anormalidades numéricas dos cromossomos 7, 8 e 12 foram avaliáveis em 124/132 (93.9%) dos casos estudados por iFISH. Igualmente as análises anteriores, foi-se utilizado um ponto de corte para ganho, calculado em 10 casos com alta porcentagem de células normais (VARELLA-GARCIA et al. 2009) (Tabelas 8-10.1). O cálculo para estabelecer o ponto de corte para ganho de cada cromossomo foi baseado na seguinte fórmula matemática:

$$\text{Média (número de núcleos com ganhos)} + 2^* \text{Desvio Padrão.}$$

Tabela 8 - Representação de dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de ganho do cromossomo 7.

Amostras de TE	Número de alterações gênicas em cada amostra	
	Normal	Ganho
TE9	98	2
TE11	96	4
TE13	98	2
TE25	97	3
TE38	93	7
TE113	95	5
TE63	98	2
TE68	96	4
TE71	92	8
TE73	93	3

Tabela 8.1 - Cálculo matemático para limites de ganho extra do cromossomo 7.

Cálculo matemático	Valor
Média (Núcleo com ganho)	4
2*Desvio Padrão	4.21
<i>Cut-off</i> para ganho	8.21

Tabela 9 - Representação de dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de ganho do cromossomo 8.

Amostras de TE	Número de alterações gênicas em cada amostra	
	Normal	Ganho
TE9	98	2
TE10	92	8
TE15	96	4
TE27	98	2
TE38	97	3
TE115	91	9
TE67	97	3
TE69	95	5
TE87	96	4
TE90	98	2

Tabela 9.1 - Cálculo matemático para limites de ganho extra do cromossomo 8.

Cálculo matemático	Valor
Média (Núcleo com ganho)	4.2
2*Desvio Padrão	4.97
<i>Cut-off</i> para ganho	9.17

Tabela 10 - Representação dos dez amostras normais usadas para o cálculo do limite de ganho do cromossomo 12.

Amostras de TE	Número de alterações gênicas em cada amostra	
	Normal	Ganho
TE9	98	2
TE10	98	2
TE15	96	4
TE27	93	7
TE38	98	2
TE115	97	3
TE67	97	3
TE69	94	6
TE87	93	7
TE90	97	3

Tabela 10.1 - Cálculo matemático para limites de ganho extra do cromossomo 12.

Cálculo matemático	Valor
Média (Núcleo com ganho)	3.9
2*Desvio Padrão	4.04
<i>Cut-off</i> para ganho	7.94

Desta forma, o ponto de corte empregado para a análise dicotômica dos valores (sem ou com alteração no número de cópias cromossômicas) foi de >8%, 9%, 8% para cada cromossomo, respectivamente. Valores esses concordantes com dados já publicados (ZIELENSKA et al. 2001). Porém, a fim de se obter um critério mais estrigente (alta especificidade, baixa sensibilidade), o ponto de corte passou a ser >10% para todos as sondas centroméricas analisadas. E, as células com duas cópias dos cromossomos serviram como controles interno negativos.

Os casos analisados apresentaram uma heterogeneidade celular intratumoral em relação à distribuição do número de cópias dos sinais fluorescentes por célula. Embora o número de cópias dos cromossomos variassem de 3 a 5 sinais em amostras com ganho, a grande maioria dos casos tumorais mostraram mais clones celulares com três números de cópias de cada um dos cromossomos estudados. Dos casos avaliáveis, 12/124 (9.7%) casos (8 tumores primários e 4 recorrências tumorais) apresentaram trissomia do cromossomo 7, na maioria dos clones celulares.

Em relação ao cromossomo 8, as análises de iFISH mostraram a presença de aberrações genéticas em 27/124 (21.8%) casos (18 tumores primários e 9 recorrências tumorais), sendo essa aberração a mais freqüente que os outros cromossomos estudados.

Em relação ao cromossomo 12, as análises de iFISH mostraram aberrações genéticas em 18/124 (14.5%) casos (13 tumores primários e 5 recorrências tumorais).

Nesta análise, todos os quatro casos pareados apresentaram alterações quanto ao número de cópias para os cromossomos inteiros. Desses casos, apenas um caso mostrou o tumor primário apresentando aberração do cromossomo 8, com a metástase tumoral apresentando deleção da região 16q21-16q22.1. No entanto, os outros três casos mostraram somente recaídas tumorais apresentando as seguintes aneussomias: dois casos apresentaram extras cópias dos cromossomos 7, 8 e 12, simultaneamente, e um caso apresentou ganho do cromossomo 8. A

Tabela 11 apresenta as alterações genéticas em casos de recaída tumoral das análises pareadas de iFISH estudadas.

Tabela 11 - Alterações genéticas dos casos pareados (tumor primário vs recaída tumoral)

Casos	Espécime Tumoral	Alterações genéticas:	Alterações genéticas:	Aneuploidia
		1q32.1	16q21	7,8,12/ ou 8
1	Primário	N	Não	Trissomia 7, 8
	Metástase	Não	Ganho	Trissomia 7, 8, 12
2	Primário	Ganho	Não	Não
	Metástase	Não	Deleção	Trissomia 7, 8, 12
3	Primário	Não	Não	Não
	Metástase	Não	Deleção	Trissomia, 8
4	Primário	Não	Não	Trissomia, 8
	Metástase	Não	Deleção	Não

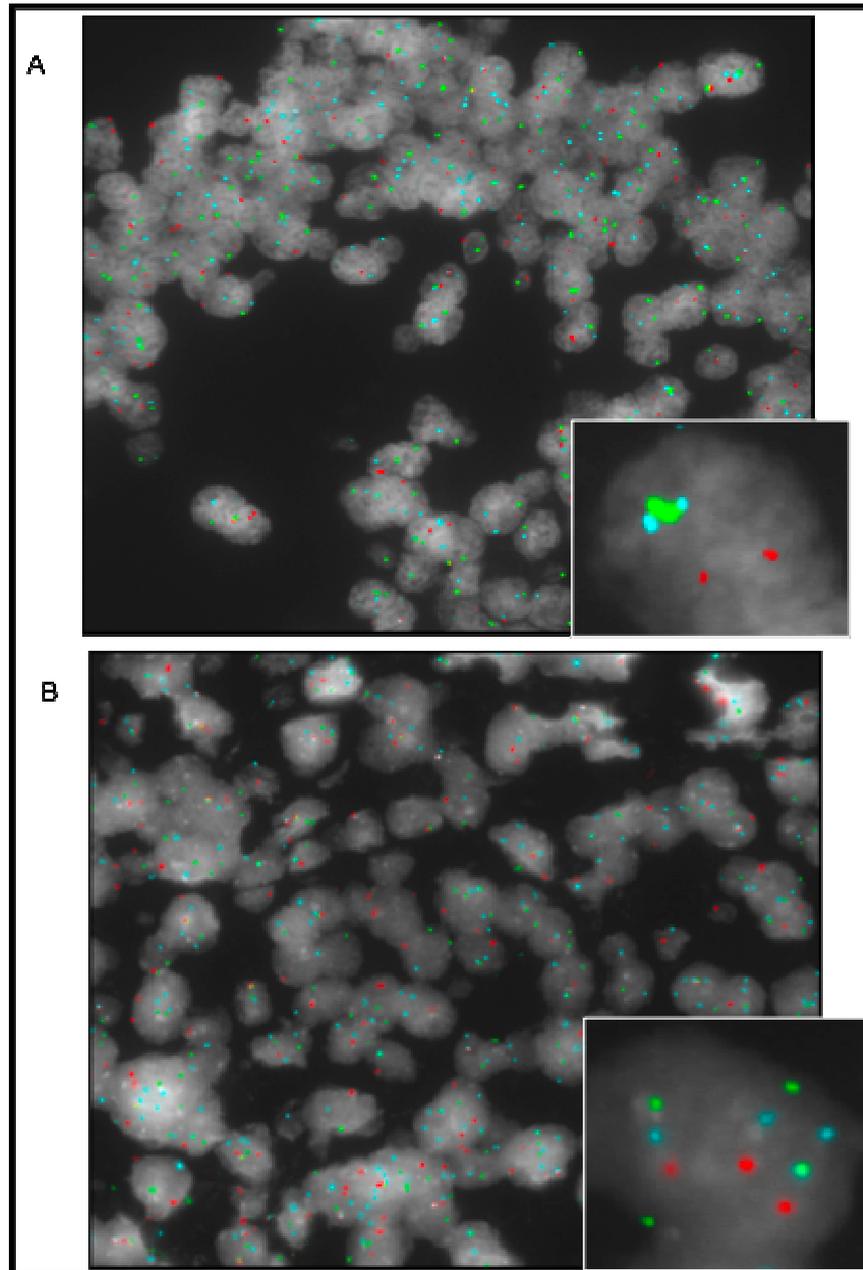
Os resultados do escore das alterações genéticas dos cromossomos 7, 8 e 12 estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Frequência de amostras com alterações no número de cópias dos cromossomos 7, 8 e 12, em 124 pacientes avaliáveis.

Alteração no número de cópias	Frequência de amostras com alterações genéticas N(%)		
	Cr.7	Cr.8	Cr.12
Polissomia	12 (9.7)	27 (21.8)	18 (14.5)

Legenda: Cr. = cromossomo

A Figura 14 representa os tipos de alterações genéticas encontradas para esses cromossomos.



Legenda: As regiões centroméricas dos cromossomos foram marcadas com sondas comerciais (Vysis Inc.), nas cores: CEP(7), laranja; CEP(8), azul; CEP(12), verde. **A)** Imagem representativa de iFISH mostrando núcleos tumorais sem alteração no número de cromossomos 7, 8 e 12. Nesta imagem, nota-se dois sinais de cada sonda correspondendo a dissomia de cada cromossomo analisado (detalhe); **B)** iFISH mostrando núcleos tumorais com alteração no número de cromossomos 7, 8 e 12. Três cópias de cada cromossomo.

Figura 14 - Imagens representativas de iFISH mostrando o número de cópias dos cromossomos 7, 8 e 12 pela técnica de iFISH em tumores de Ewing. O painel mostra imagens em pseudo-DAPI contra-corando núcleos tumorais em cinza para facilitar a interpretação. 63x.

Grau de ploidia em tumores de Ewing:

O conteúdo de DNA nos tumores de Ewing avaliados neste estudo seguiu os critérios de Rossi et al. (2005) em 124 pacientes. Assim, o grau de ploidia dos pacientes foi classificado como: diploides em 115 (85.2%) casos, e triploides em 9 (6.7%) casos. A Figura 14 representa um caso de ploidia dentro do presente estudo.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS ENTRE AS ALTERAÇÕES GENÉTICAS E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

As análises univariadas mostraram uma associação estatisticamente significativa entre ganhos da região 1q32.1 e deleções da região 16q21-q22.1 ($p=0.029$) na população total. No grupo com doença localizada, uma associação estatisticamente significativa também foi encontrada entre essas regiões ($p=0.038$). Em ambos os grupos, a maioria dos pacientes que apresentaram deleção, não apresentaram alteração do locus 1q32.1. No entanto, quando associado a região 16q com as alterações genéticas ao longo do braço 1q, a maioria dos pacientes que apresentaram deleção de 16q, apresentaram ganho da região 1q21-1q32, demonstrando, então, que pode haver uma interação genética de uma porção maior dos braços dos cromossomos 1 e 16 (Tabela 13.1-13.3).

Tabela 13 - Associação entre o região do gene *CDH11* em relação a região 1q32.1 em 114 casos avaliáveis.

Cromossomos	Alterações	16q21		P valor
		Dissomia (%)	Deleção (%)	
1q32.1	Dissomia	93 (93)	7 (7)	0.029
	Ganho(≥3)	10 (71.4)	4 (28.6)	

Tabela 13.1 - Associação entre o região do gene *CDH11* em relação a região 1q32.1 em 83 casos avaliáveis de pacientes com doença localizada.

Cromossomos	Alterações	16q21		P valor
		Dissomia (%)	Deleção (%)	
1q32.1	Dissomia	69 (92)	6 (8)	0.038
	Ganho (≥3)	5 (62.5)	3 (37.5)	

Tabela 13.2 - Associação entre o região 16q em relação a região 1q21-1q32 em 114 casos avaliáveis.

Cromossomos	Alterações	16q		P valor
		Dissomia (%)	Deleção (%)	
1q21-1q32	Dissomia	75 (96.2)	3 (3.8)	0.04
	Ganho (≥3)	28 (77.8)	8 (22.2)	

Tabela 13.3 - Associação entre o região 16q em relação a região 1q21-1q32 em 83 casos avaliáveis.

Cromossomos	Alterações	16q		P valor
		Dissomia (%)	Deleção (%)	
1q21-1q32	Dissomia	56 (94.9)	3 (5.1)	0.015
	Ganho (≥3)	18 (75)	6 (25)	

Ainda, foi-se observado outra associação estatisticamente significativa entre o ganho da região 16q21-16q22 e o ganho no número do cromossomo 7 ($p=0.005$), 8 ($p=0.037$) e 12 ($p<0.0001$) na população total (Tabela 14). Porém, no grupo de pacientes com doença localizada, somente pacientes com ganhos do cromossomo 12 mostraram uma associação estatisticamente significativa com ganhos da região do gene *CDH11* ($p=0.003$) (Tabela 15). Nesse grupo, 62.5% dos casos com ganhos da região 16q21-q22.1 também mostraram cópias extras do cromossomo 12, enquanto que, 37.5% dos casos que tiveram ganho de 16q21-q22.1 apresentaram número de cópias normais para o cromossomo 12. Também, foi-se observado uma associação estatisticamente significativa entre as aneussomias dos cromossomos 7, 8 e 12 ($p<0.001$) em todos os grupos. Vê-se, portanto, que os pacientes analisados mostraram uma interação quanto às alterações do número de cópias genômicas estudadas, destacando ganhos na região 16q21 como sendo comuns a essas alterações (Figura 15).

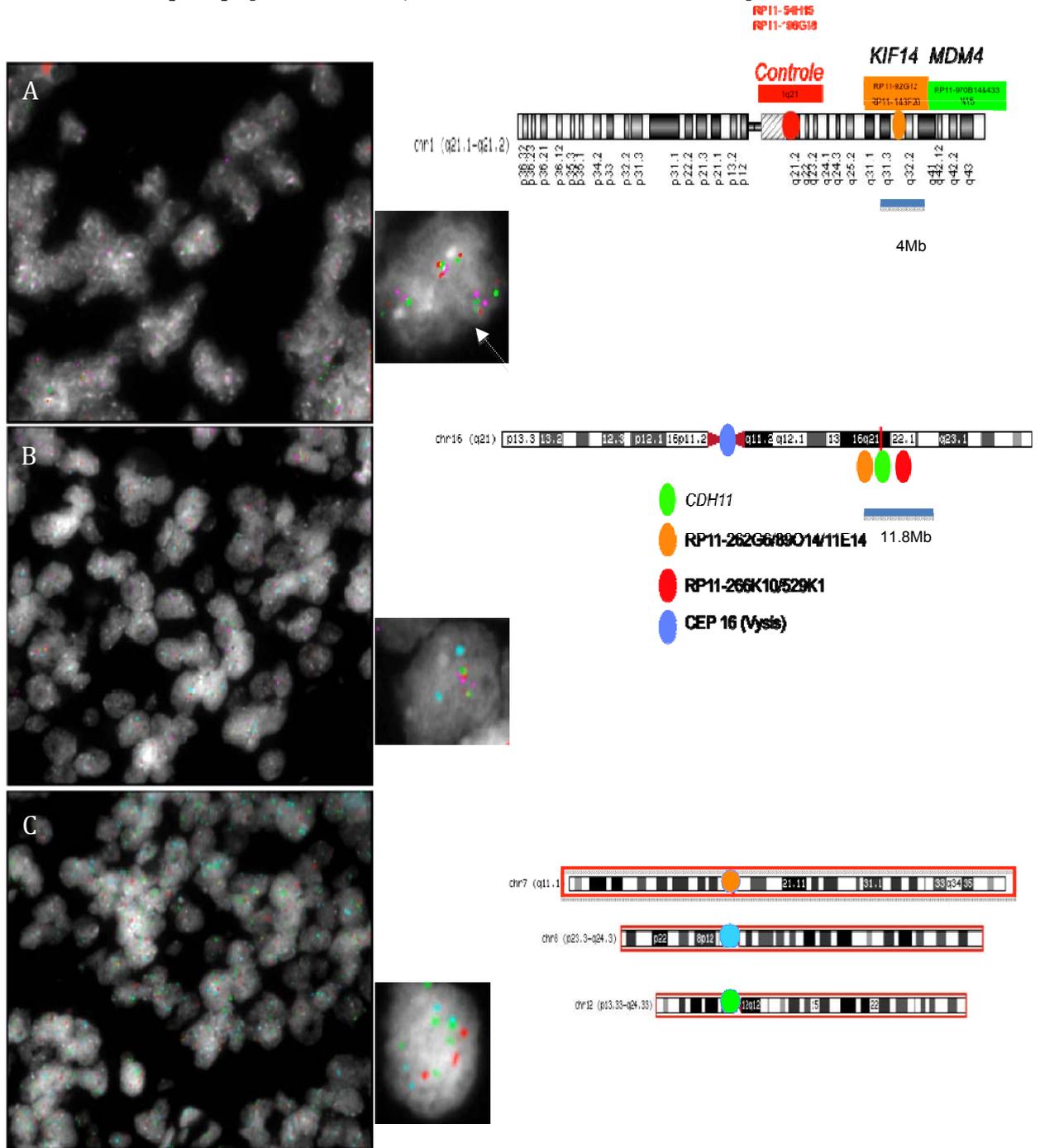
Tabela 14 - Associação entre a região do gene *CDH11* em relação ao número dos cromossomos 7, 8, 12 em 114 casos avaliáveis.

Variáveis	Categorias	16q21		P valor
		2 (%)	≥3 (%)	
7	Dis	92 (92)	7 (58.3)	0.005
	Tris/Pol	8 (8)	5 (41.7)	
8	Dis	79 (79)	6 (50.0)	0.037
	Tris/Pol	21 (21)	6 (50.0)	
12	Dis	89 (89)	5 (41.7)	0.0001
	Tris/Pol	11 (11)	7 (58.3)	

Tabela 15 - Associação entre a região do gene *CDH11* e o número de cópias dos cromossomos 7, 8, 12 em 83 casos com doença localizada.

Variáveis	Categorias	16q21		P valor
		2 (%)	≥3 (%)	
7	Dis	66 (90.4)	5 (62.5)	0.055
	Tris/Pol	7 (9.6)	3 (37.5)	
8	Dis	59 (80.8)	4 (50.0)	0.068
	Tris/Pol	14 (19.2)	4 (50.0)	
12	Dis	64 (87.7)	3 (37.5)	0.003
	Tris/Pol	9 (12.3)	5 (62.5)	

Legenda: Dis: dissomia; Tris:trissomia; Pol:polissomia



Legenda: O painel do lado esquerdo mostra imagens em pseudo-DAPI contra-corando os núcleos tumorais com um tom cinza para facilitar a interpretação, 63x. O painel do lado direito mostra a estratégia usada para mapear essas regiões de alterações secundárias nos cromossomos representados acima. (A) A imagem representa a reação de iFISH identificada com três cores; laranja, o gene *KIF14/DDX59*; verde, o gene *MDM4/PI3KC2B* e rosa/pink, a região do centrômero com ganho do número de cópias dos genes (1q32.1). (B) O ganho da região 16q21 representado em detalhe, indicando o gene *CDH11* (verde), as sondas controles (laranja e rosa) e o CEP16 (azul). Somente as cópias da região centromérica encontrou-se intacta. (C) Ganho dos cromossomos 7 (laranja); 8 (Azul) e 12 (Verde) (Vysis Inc).

Figura 15 - Identificação da interação entre as alterações do número de cópias de genes e dos cromossomos em um caso (2.I do TMA) de tumores de Ewing por multicolor iFISH.

Quando os dados clínico-patológicos foram associados a todas as alterações genéticas, as análises univariadas mostraram associação estatística entre recaída tumoral, ganhos da região 1q32.1, ganhos e deleções da região 16q21 tanto na população total quanto no grupo de doença localizada. Desta forma, observamos uma associação estatisticamente significativa entre ganhos do locus 1q32.1 e recaída tumoral na população total ($p=0.023$) e no grupo de doença localizada ($p=0.005$). Igualmente, encontramos uma associação estatisticamente significativa entre, ganhos do locus 16q21 (*CDH11*) e recaída tumoral, na população total ($p=0.017$) e no grupo de doença localizada ($p=0.029$).

Para as análises de sobrevida global (SG), 131 casos da população total e 95 casos do grupo com doença localizada foram selecionados. Enquanto que, para a sobrevida livre de evento (SLE), 89 casos foram separados para os cálculos estatísticos.

SOBREVIDADE GLOBAL EM TUMORES DE EWING

A mediana da sobrevida global da população total dessa casuística foi de 30.7 % em 5 anos (Figura 16).

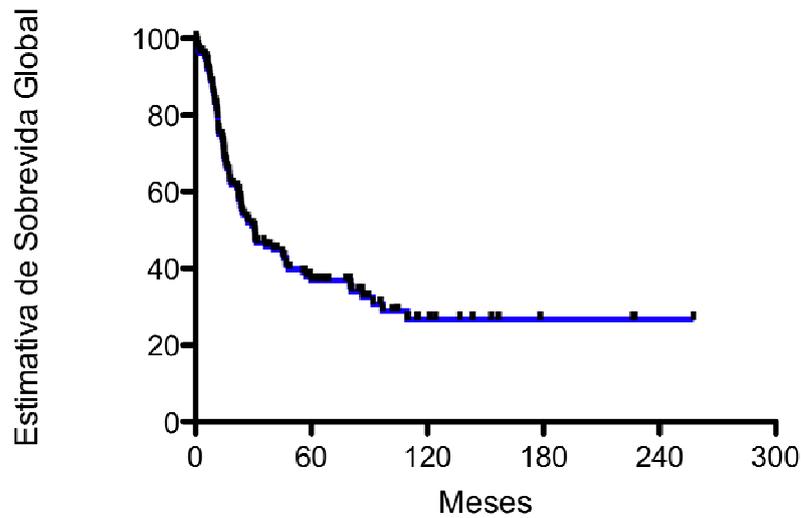


Figura 16 - Curva de sobrevida global (30.7%).

Pacientes com idade inferior a 15 anos, ao diagnóstico, mostraram melhores taxa de sobrevida global do que pacientes com idade superior a 15 anos ($p=0.02$), na população total. Diferentes pontos de corte foram feitos nesta população (de 9 anos até 20 anos de idade); entretanto, o grupo de ≤ 15 anos *versus* > 15 anos foi a idade mais significativa para predizer a sobrevida global dos pacientes portadores de tumores de Ewing desse estudo (Figura 17). As análises univariadas de estimativas de SG revelaram que a recaída tumoral foi um fator preditivo, assim, pacientes com doença recorrente tiveram piores taxas de sobrevida, tanto na população total ($p<0.0001$) como no subgrupo com doença localizada ($p<0.0001$), caracterizando a consistência dos dados clínicos coletados.

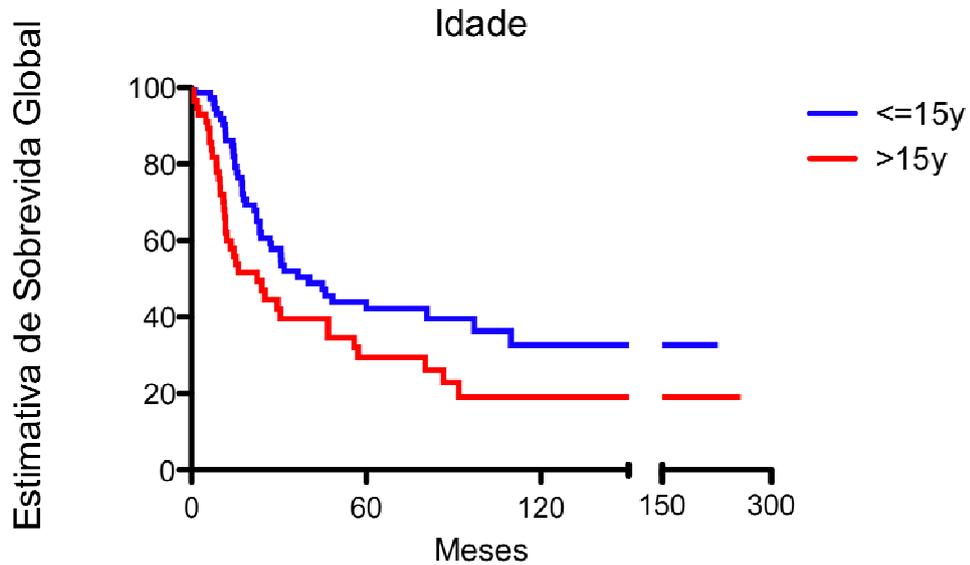
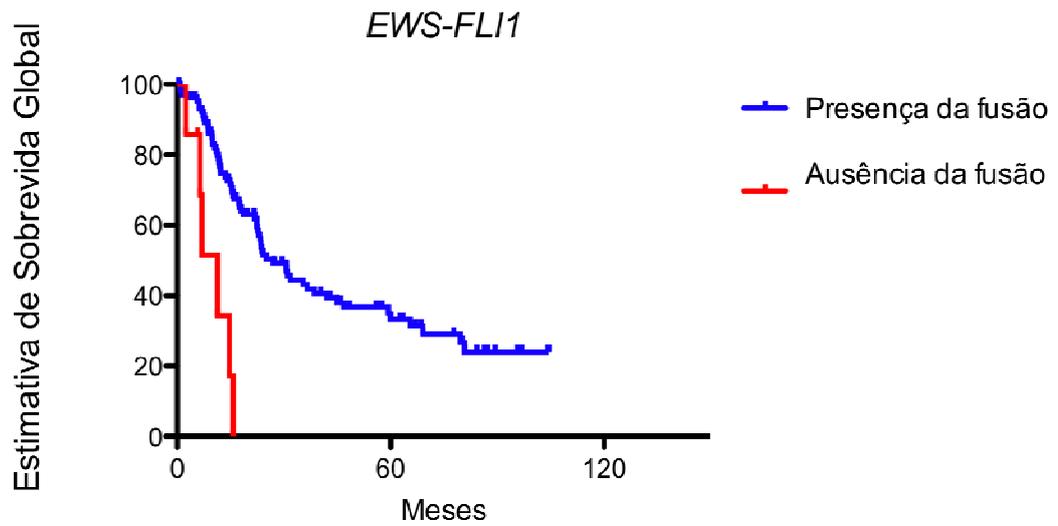


Figura 17 - Curva de Kaplan – Meier e teste de Log-Rank mostrando a estimativa de sobrevida global para idade ($p=0.022$) na população total do estudo.

Entre os parâmetros genéticos testados, pacientes que mostraram a fusão dos genes *EWSR1-FLI1* foram associados a altas taxas de SG ($p<0.0001$) quando comparado com pacientes que não apresentaram essa translocação genética na população total (Figura 18a). No entanto, pacientes que apresentaram doença localizada ao diagnóstico, não mostraram associação estatisticamente significativa com esse tipo de alteração genética. Ainda, pacientes com doença localizada e com a presença de ganho da região 16q21 apresentaram prognóstico ruim ($p=0.04$) (Figura 18b).

A.



B.

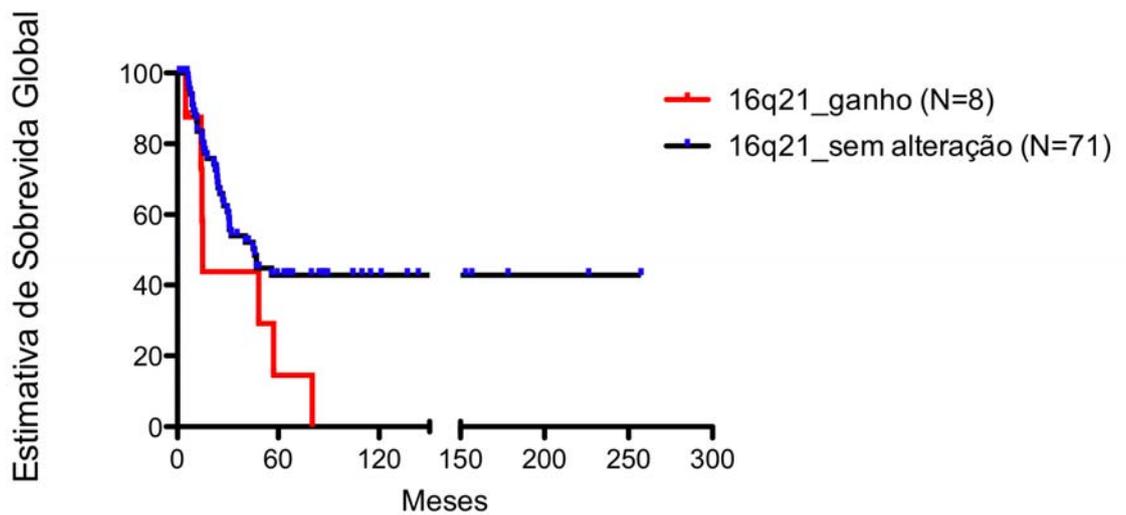


Figura 18 - Curva de Kaplan – Meier e teste de Log-Rank mostrando a estimativa de sobrevida global. **A.** Influência de *EWS-FLI1* ($p < 0.0001$) na população total do estudo. **B.** Influência da região 16q21 ($p = 0.04$) em tumores de Ewing em doença localizada.

SOBREVIVIDADE LIVRE DE DOENÇA EM TUMORES DE EWING

A análise de sobrevida livre de doença em 5 anos nos casos de TE foi de 35.16% (Figura 19).

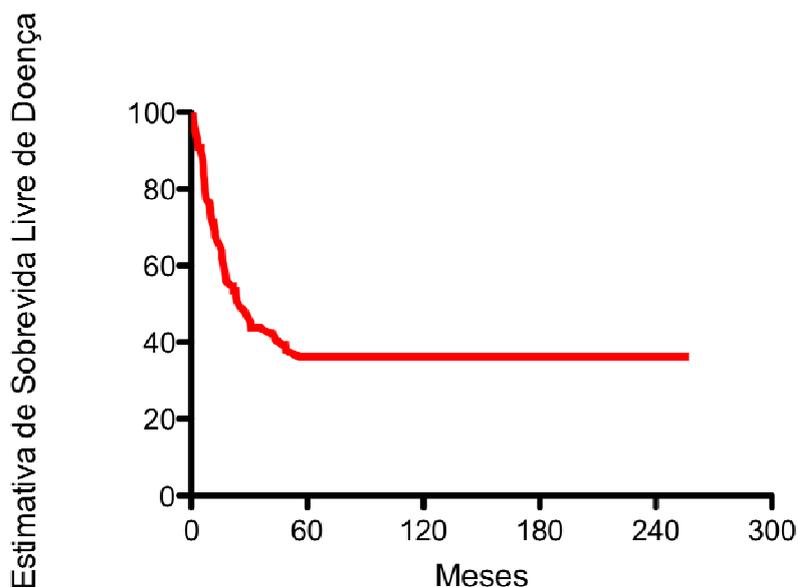
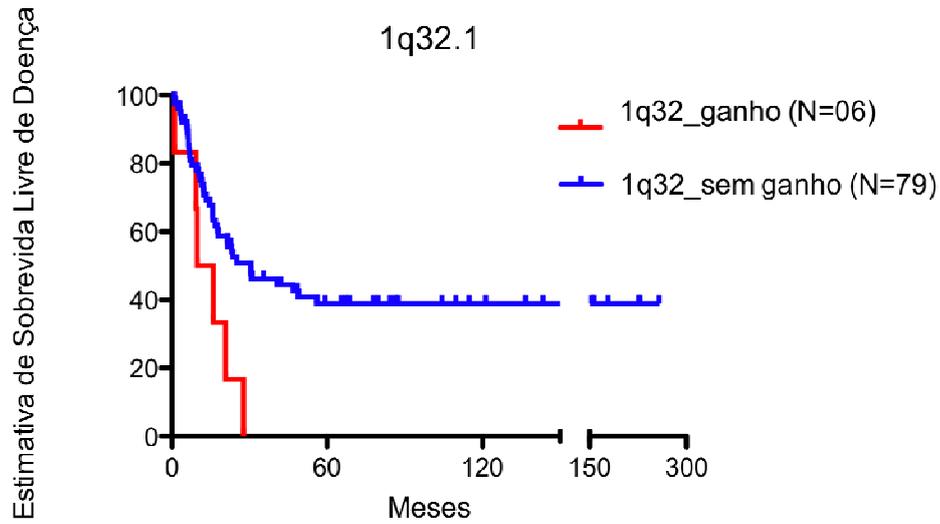


Figura 19 - Curva de Sobrevida livre de doença (35.16%).

Para essa análise, pacientes incluídos no grupo com ganho da região **1q32.1** mostraram piores taxas de SLE ($p=0.014$), do que pacientes sem essa anormalidade genética (Figura 20a, Tabelas 13 e 14). Da mesma forma, pacientes pertencentes ao grupo com ganho da região **16q21** foram associados a pior SLE, quando comparados com o grupo de pacientes que mostraram deleções nessa mesma região ($p=0.002$) (Figura 20b e Tabelas 16 e 17).

A.



B.

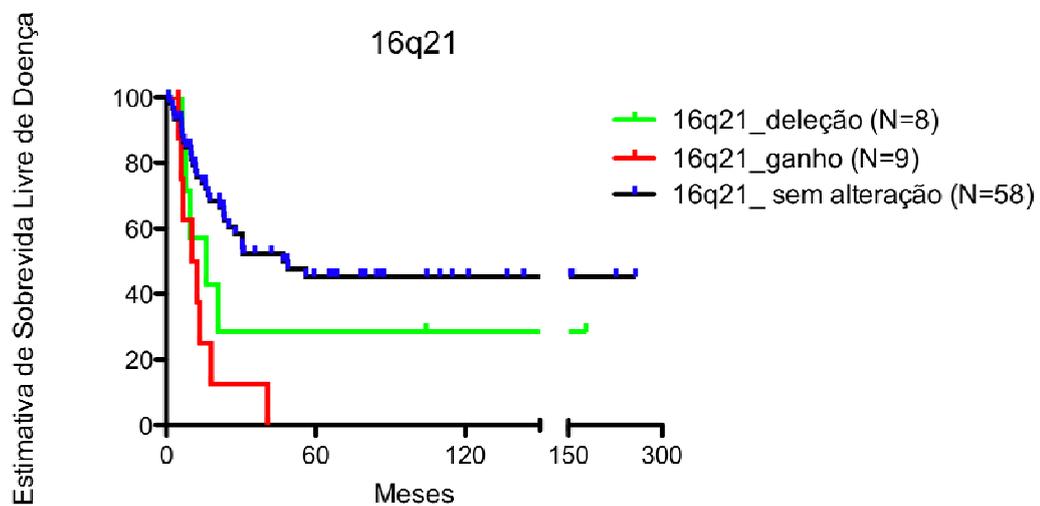
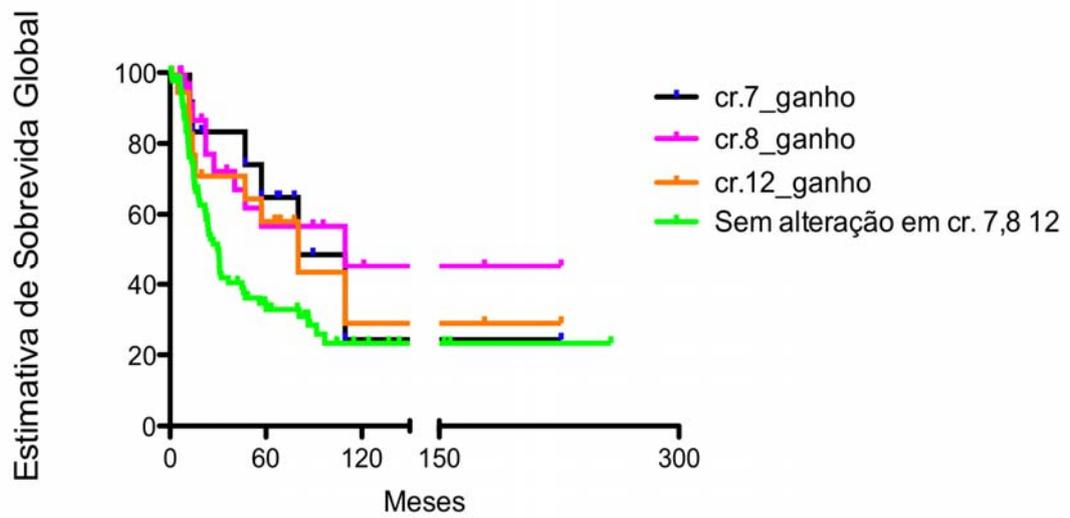


Figura 20 - Curva de Kaplan – Meier e teste de Log-Rank mostrando a estimativa de sobrevida livre de doença para as regiões estudadas. **A)** 1q32.1 ($p= 0.014$) e **B)** 16q21 ($p=0.002$) em pacientes com tumores de Ewing.

Significativamente, as cópias extras dos cromossomos 7, 8 e 12 mostraram somente significância estatística com SG. Assim, o grupo de pacientes da população total que apresentaram ganhos do cromossomo 8 (bom prognóstico) mostraram, através do teste de *Log-rank*, uma associação estatisticamente significativa; isto é, esse grupo mostrou maiores taxas de sobrevida global do que pacientes que não apresentaram cópias extras do cromossomo 8 ($p=0.04$) (Figura 21a). Vale ressaltar que, somente ganho do cromossomo 8 apresentou associação estatisticamente significativa, tanto na subgrupo de doença localizada ($p=0.04$) quanto na população geral ($p=0.02$). Em adição a isso, quando todos os parâmetros genéticos estudados foram combinados, as análises estatísticas estratificaram grupos de pacientes com piores taxas de SG e de SLE para a doença. Isto é, ganhos do cromossomo 8 e do cromossomo 12, quando presentes simultaneamente em um mesmo paciente, identificaram grupos distintos de pacientes e taxas de SG estatisticamente significantes ($p=0.029$) (Figura 21b).

A.



B.

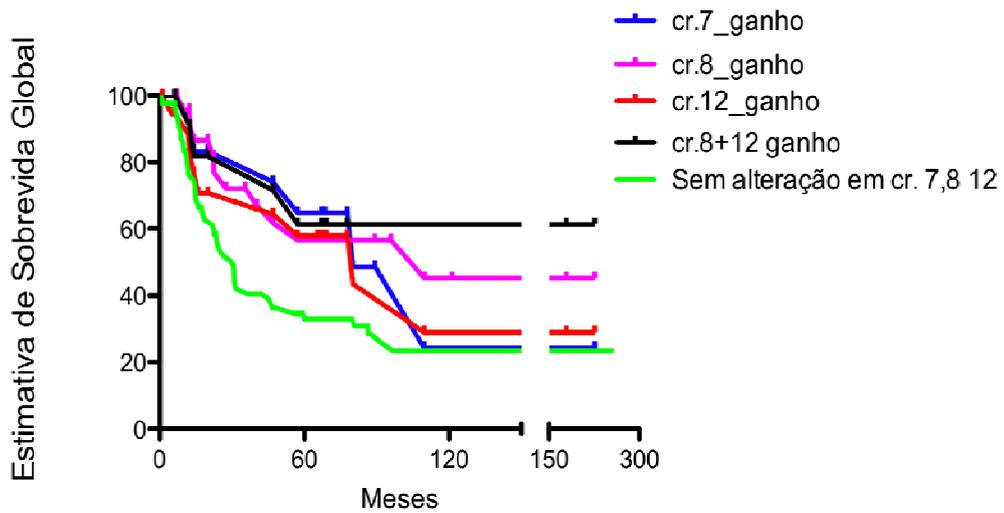


Figura 21 - Curva de Kaplan – Meier e teste de Log-Rank mostrando a estimativa de sobrevida global para os cromossomos 7, 8 ou 12. **A)** Comparação de cópias extras dos cromossomos ($p= 0.04$); **B)** Destaque para as cópias extras do cromossomo 8 juntamente com alterações do cromossomo 12 ($p=0.029$) em pacientes com tumores de Ewing.

Além disso, pacientes que mostraram ganhos da região 16q21, concomitantemente com ganhos do cromossomo 7, 8 e/ou 12 tiveram as piores taxas de SLE do que outras interações ($p=0.006$) (Figura 22). As Tabela 16 e 17 resumam as análises de estimativas de SG e SLE em 5 anos com a população do estudo e suas características clínicas e genéticas.

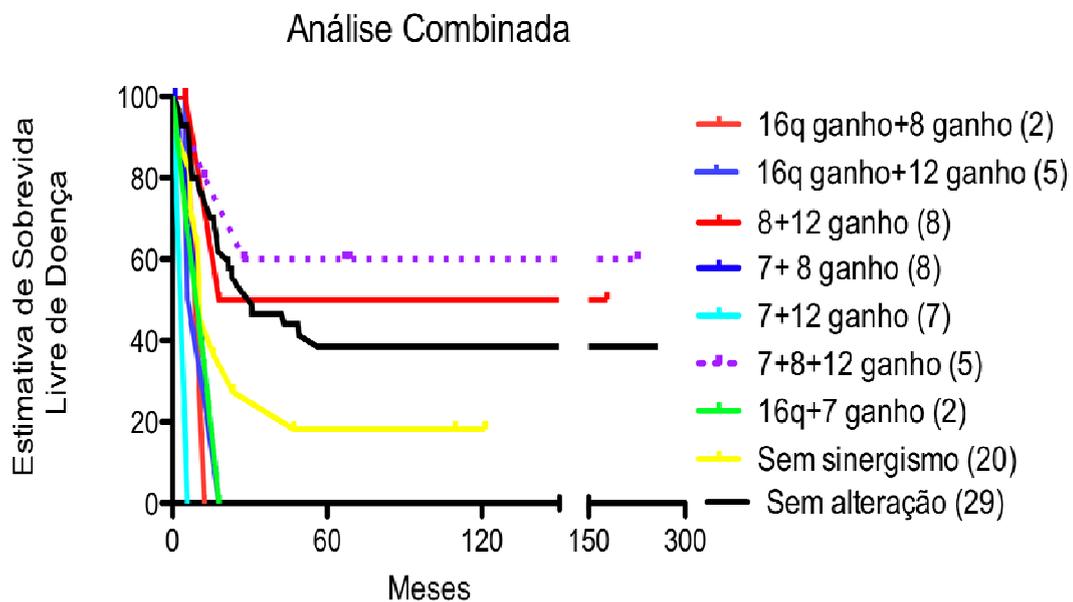


Figura 22 - Curva de Kaplan – Meier e teste de Log-Rank mostrando a estimativa de sobrevida livre de doença dos cromossomos 7, 8 e 12 com simultâneos ganhos da região 16q21 ($p= 0.006$) em pacientes com tumores de Ewing. Os números entre parêntese correspondem a quantidade de pacientes com tais alterações genéticas.

Tabela 16 - Estimativas de sobrevida global de acordo com os parâmetros clínicos e genéticos de todos os pacientes com tumores de Ewing e com doença localizada.

Parâmetros	Todos os pacientes do estudo (N=132)			Pacientes com doença localizada (N=95)		
	Resultados de iFISH no. de pts	SG- 5 anos Mediana de sobrevida (meses) (95% CI)	P	Resultados de iFISH no. de pts	SG- 5 anos Mediana de sobrevida (95% CI)	P
Doença ao diagnóstico						
Localizada	95	31.84				
Disseminada	37	17.93				
Total	132	1.8(1.1-2.4)	0.137			
Sítio do tumor						
Osseo	119	30.72		84	36.51	
Extraosseo	13	17.53	0.877	13	24.18	0.921
		1.75(1.3-2.2)			1.5(1.0-1.9)	
Idade						
≤ 15 anos	73	36.51		55	31.84	
>15 anos	59	22.6	0.022	44	36.51	
		1.6(0.96-2.3)			0.87(0.28-1.4)	0.505
Gênero						
Masculino	79	30.95		55	45.07	
Feminino	53	24.18		42	26.97	
		1.28(0.63-1.9)	0.380		1.67(1.0-2.2)	0.272
Recaída						
Não	67	-		49	24.18	
Sim	64	23.8	<0.0001	47	0	<0.0001
EWSR1-FLII						
Fusão	121	30.95		88	40.36	
Break-apart	8	11.8	0.0002	6	11.8	
Ignorado	3	6.02		2	42.92	0.226

Impacto prognóstico de aberrações cromossômicas em tumores de Ewing/PNET

Parâmetros	Todos os pacientes do estudo (N=132)			Pacientes com doença localizada (N=95)		
	Resultados de iFISH no. de pts	SG- 5 anos Mediana de sobrevida (meses) (95% CI)	P	Resultados de iFISH no. de pts	SG- 5 anos Mediana de sobrevida (meses) (95% CI)	P
Cromossomo 1						
1q32 gain	15	33.62		8	40.36	
No CNA	10	30.59	0.393	82	31.84	0.382
Cromosome 16						
Ganho 16q21	13	15		8	14.9	0.004
Sem alteração	115	31.5 31	0.420	71	45.92 3.2 (1.0-9.7)	
Cromossomo 7						
Ganho	13	80.16		10	80.16	
Sem alteração	108	30.6 2.6(2.2-3.0)	0.1	76	30.86 2.6 (2.2-3.0)	0.16
Cromossomo 8						
Ganho	27	109.6		18	-	
Sem alteração	94	30.6 3.6(3.1-4.1)	0.02	68	30.59 0.5 (0.3-1.0)	0.04
Cromossomo 12						
Ganho	18	80.16	0.28	14	80.16	
Sem alteração	103	30.16 2.6 (2.1-3.1)		72	30.86 2.6 (2.2-3.0)	0.25

Tabela 17 - Estimativas de sobrevida livre de evento de acordo com os parâmetros clínicos e genéticos de pacientes com tumores de Ewing localizado.

Pacientes portadores de Tumores de Ewing localizado			
Parâmetros	Resultados de iFISH no. de pts	SLE- 5 anos Mediana de sobrevida (meses) (95% CI)	P
Doença ao diagnóstico			
Localizada	89		
Disseminada	0		
Sítio do tumor			
Osseo	78	25.16	0.941
Extraosseo	11	55.99 0.4(0.02-0.87)	
Idade			
≤ 15 anos	52	23.55	0.239
>15 anos	37	27.76 0.8(0.2-1.4)	
Gênero			
Masculino	50	30.86	0.178
Feminino	39	16.71 1.8(1.3-2.4)	
Recaída			
Não	48	-	<0.0001
Sim	41	13.32 30.59	
EWSR1-FLI1			
Break-apart	7	7.01	0.299
Fusão	81	30.85	
Ignorado	1		
Cromossomo 1			
1q 32gain	6	12.91	0.0145
Sem alteração	79	30.59	
Ignorado	4	0.42(-3.10 ² -0.8)	

Impacto prognóstico de aberrações cromossômicas em tumores de Ewing/PNET

Pacientes portadores de Tumores de Ewing localizado			
Parâmetros	Resultados de iFISH no. de pts	SLE- 5 anos Mediana de sobrevida (meses) (95% CI)	P
Cromossomo 16			
Ganho 16q21	8	-	
Perda 16q21	9	-	
Sem alteração	63	-	0.002
Ignorado	9		
Cromossomo 16			
Ganho 16q21	8	11.33	
Sem alteração	71	30.86 0.3(-0.09-0.8)	0.001
Cromossomo 16			
Perda 16q21	9	16.05	0.36
Sem alteração	70	30.86 0.52(0.120.91)	
Cromossomo 7			
Ganho	9	142.6	
Sem alteração	72	23.6 0.2(0.2-0.5)	0.36
Cromossomo 8			
Ganho	16	109.8	
Normal	65	23.09 4.8 (4.3-5.2)	0.145
Cromossomo 12			
Ganho	13	27.76	
Normal	68	25.16 1.1 (0.68-1.5)	0.5
Cromossomo 16q21+12			
Ganho	5	-	
Sem alteração	76	-	0.007

Em relação aos casos classificados como ploidia, foi-se verificado uma associação estatisticamente significativa entre ganhos da região 16q21 e anaploida ($p=0.007$). O grupo de pacientes que mostraram ganhos dessa região estava mais concentrado no grupo de diploidia (66.7 *versus* 33.3%).

Vale ressaltar que uma associação estatisticamente significativa não foi encontrada entre os grupos de pacientes tratados e não tratados com quimioterapia ou radioterapia e as alterações genéticas estudadas ($p>0.05$).

E, apesar dos distintos regimes quimioterápicos a que esses pacientes foram submetidos, não houve alguma diferença estatística entre as taxas de sobrevida global dos três diferentes momentos de protocolos de tratamento, pertencentes à época da coleta dos dados clínico-patológicos - 75-80 anos, 81-1999 anos e 2000-2009 anos ($p=0.55$). Este resultado indica que a quimioterapia neo-adjuvante não afetou a frequência de alterações genéticas desta casuística.

Em relação às análises multivariadas de regressão proporcional de Cox, foram usados aqueles fatores que mostraram significância estatística em relação à sobrevida dos pacientes nas análises univariadas (Tabela 18). Portanto, idade, recaída tumoral, fusão dos genes *EWSR1/FLI1* e trissomia do cromossomo 8, mantiveram-se como fatores prognósticos independentes para sobrevida global. Enquanto que, ganhos da região 1q32.1 ou 16q21 foram confirmados como marcadores independentes de prognóstico para sobrevida livre de evento. Pacientes que mostraram ganhos da região 16q21 apresentaram maiores riscos de recorrência do que os pacientes que tiveram deleção dessa região. Ademais, somente a interação entre o grupo

com ganho da região 16q21 e ganho do cromossomo 12 permaneceram como fatores independentes para sobrevida livre de doença. Todavia, a deleção da região 16q21 ou as aneussomias dos cromossomos 7, 8 ou 12 não mostraram valor relevante como fatores preditivos de morte. Os valores de risco de morte de acordo com os parâmetros avaliados, pelo modelo de Cox, estão descritas na Tabela 19 e 20.

Tabela 18 - Parâmetros genéticos que mostraram significância estatística em relação à sobrevida dos pacientes nas análises univariadas. IC: intervalo de confiança.

Variáveis	Sobrevida Global/localizada		Sobrevida livre de doença	
	N. pacientes (%)	p-valor	N. pacientes (%)	p-valor
1q32.1 ganho	8(8.9)	0.38	6(7.1)	0.014
16q21 ganho	9(10.7)	0.1	9 (10.1)	0.002
16q21 deleção	9(10.7)		9(11.4)	
Cr7 ganho	10(11.6)	0.16	9(10.1)	0.36
Cr8 ganho	18(20.9)	0.04	16 (19.8)	0.14
Cr12 ganho	14(16.3)	0.25	13(16.0)	0.5
Cr12/16q21+	-	-	5 (6.2)	0.007

Tabela 19 - Análise multivariadas de regressão de Cox dos fatores clínico-patológicos e genéticos em 131 pacientes com Tumores de Ewing: **Sobrevidade Global** IC: intervalo de confiança

Fatores prognósticos	Categorias	Risco	IC (95%)	p valor
Idade ≤15 years versus > 15 years	Ausente	1.0 (Ref.)	1.06-2.12	0.02
	Presente	1.5		
Recaída	Ausente	1.0 (Ref.)	1.2-2.6	0.0024
	Presente	1.8		
<i>EWSR1/FLI1</i>	Ausente	1.0 (Ref.)	0.2-0.8	0.0079
	Presente	0.37		
Trissomia 7	Ausente	1.0 (Ref.)	0.2-1.2	0.14
	Presente	0.53		
Trissomia 8	Ausente	1.0 (Ref.)	0.2-0.9	0.0174
	Presente	0.4		
Trissomia 12	Ausente	1.0 (Ref.)	0.3-1.3	0.21
	Presente	0.63		

Tabela 20 - Análise multivariada de regressão de Cox dos fatores genéticos em 89 pacientes com Tumores de Ewing: **Sobrevidade Livre de Doença**
 IC: intervalo de confiança

Fatores prognósticos	Categorias	Risco	IC (95%)	p valor
Ganho 1q32.1	Ausente	1.0 (Ref.)	1.2-6.6	0.023
	Presente	2.8		
Ganho 16q21	Ausente	1.0 (Ref.)	1.4-7.4	0.006
	Presente	3.2		
Deleção 16q21	Ausente	1.0 (Ref)	0.7-4.2	0.2
	Presente	1.77		
16q21	-	1.0 (Ref.)	1.5-8.3 0.8-5.0	0.0164
	Ganho	3.6		
	Deleção	2.0		
Ganho 16q21+cr. 7	Ausente	1.0(Ref)	1.0-10.9	0.053
	Presente	3.3		
Ganho 16q21+cr. 8	Ausente	1.0(Ref)	0.31-17.3	0.4
	Presente	2.3		
Ganho 16q21+cr. 12	Ausente	1.0 (Ref.)	1.3-11.4	0.011
	Presente	3.9		

5 DISCUSSÃO

Tumores de Ewing (TE) ou família de tumores de Ewing são tumores altamente agressivos em que, resistência à droga e recorrência da doença são problemas clínicos constantes. A estratificação de pacientes para tratamento, de acordo com tais riscos, são os achados que precisam ser buscados. Atualmente, apesar da presença de metástases ao diagnóstico ser consistentemente associada a prognóstico ruim, outras características clínico-patológicas dos pacientes, como: idade, volume tumoral e sítio primário são associados, variavelmente, com a evolução da doença. Ainda, intrigantemente, alguns pacientes com aparente doença localizada ao diagnóstico, rapidamente desenvolvem metástases e, conseqüentemente, morrem. Esses fatos levaram-nos a inferir a necessidade de novos marcadores tumorais para avaliar, acuradamente, o prognóstico de pacientes com tumores de Ewing, principalmente, para o grupo de pacientes com doença mais agressiva. Os aspectos genéticos desse tumor, portanto, parecem ser a via mais promissora para atingir essa meta. Para tanto, neste presente estudo foram avaliadas as implicações clínicas das alterações genéticas dos segmentos cromossômicos - 1q32.1, 16q.21 e dos cromossomos 7, 8 12 – os quais parecem estar fortemente envolvidos na evolução dos TE.

Na série de 132 pacientes aqui estudados, a confirmação do translocação (11;22) foi encontrado em 93.8% dos casos analisados, dos

quais a fusão *EWSR1-FLI1* foi vista em 87.6% deles. Somente 3 (3/121) dos casos analisados não mostraram aberração cromossômica da região 22q12, mostrando a importância da avaliação genética pela técnica de iFISH para detectar esses eventos e confirmar o diagnóstico dessa doença. Dados esses concordantes com a literatura, onde a fusão dos genes *EWSR1-FLI1* ocorre em aproximadamente 85% dos casos (MITELMAN et al. 1994; LAZAR et al. 2006; DELATTRE 2008). O número de cópias extras encontradas dos genes *EWS* e/ou *FLI1* não mostrou significância estatística nesse estudo. SAVOLA et al. (2009) reportaram a existência de uma duplicação sucessiva do cromossomo derivativo do cromossomo (22) que acompanha a fusão dos cromossomos (11;22) como sendo um evento comum e sem significância em TE. Dessa forma, ganhos desse cromossomo derivativo também foram encontrados no controle negativo, – placenta usado neste presente estudo, demonstrando ser um evento típico de células normais. Um estudo com células HeLa e linhagem celular de TE mostrou que a presença da aumento de expressão de *EWS* reorganiza o fuso mitótico defeituoso em células transfectadas com a fusão *EWSR1-FLI1* (EMBREE et al. 2009), interferindo negativamente com a função quimérica desses genes. Portanto, esses resultados sugerem a hipótese de que *EWSR1-FLI1* inibe a função de *EWS* através de um mecanismo dominante-negativo durante o processo maligno. Assim, eventos genéticos adicionais à fusão desses genes são necessários para causar tumorigênese (KOVAR 2010). De acordo com os nossos achados, a fusão *EWSR1-FLI1* mostrou bom prognóstico somente em relação a população total desse estudo,

porém esse dado é controverso na literatura, já que essa fusão tem seu valor prognóstico variável até o momento (ZOUBEK et al. 1996; LIN et al. 1999; DE ALAVA et al. 2000b, KOVAR 2010). Ainda, o grupo de pacientes com doença localizada do presente estudo, não mostrou associação estatística com a fusão desses genes.

Avançando nas análises de todos os dados coletados, observamos que as alterações no número de cópias (ANC) gênicas no segmento cromossômico 1q32.1 foram vistas em 11.7% dos casos. Um estudo de DNA *array* e FISH interfásico mostraram ganhos de 1q em 21% dos casos (HATTINGER et al. 2002). No presente estudo, para essa região, foram-se analisados quatro genes com funções de potenciais atividades oncogênicas. Pelo banco de dados virtual – Progenetix – encontramos mais de 10.000 perfis de cariótipos, CGH e CGH *array*, indicando uma alta proporção de ganhos e ampliações dessa região em tumores de mama, retinoblastoma, fígado e cervical. Todavia, o mesmo banco de dados listou somente 60 outros tumores com ganhos em pequenas frações do locus 1q32.1, incluindo tumores de Ewing (BAUDIS e CLEARY 2001). Dessa região, *KIF14* e *DDX59* foram os primeiros genes analisados no presente estudo. *KIF14*, da família das cinesinas, com importante papel no momento da citocinese mitótica (CORSON et al. 2007), e, com valor prognóstico em relação à sobrevida livre de doença em tumores de pequenas células pulmonares, é considerado um grande potencial para alvo-terapêutico. Enquanto o gene *DDX59*, pertencente a família *Box DEAD* de RNA helicases, controla a ligação da molécula de ATP e a hidrólise celular

(SJÖBLOM et al. 2006). Além disso, encontra-se relacionado com o processo de tumorigênese de cólon-reto e mama, com importante valor como alvo diagnóstico e terapêutico. Embora o aumento de expressão da proteína DDX59 seja muito menos encontrada em tumores do que o transcrito KIF14 (retinoblastoma, mama, pulmão), aquele gene pode contribuir para a sobrevivência de células tumorais e ainda participar das vias de reparo de DNA com atividade oncogênica (<http://func.med.harvard.edu>). Ainda nessa região, outros dois genes foram analisados – *MDM4* e *PIK3C2B* – ambos localizados próximos um do outro, ou seja, com aproximadamente 30Kb de distância. O gene *MDMX* ou *MDM4*, cuja proteína é conhecida por interagir com a p53, inibi as atividades de controle da integridade do genoma (SHVARTS et al. 1996). Recentes estudos em retinoblastoma mostraram o importante papel terapêutico de *MDM4* como alvo molecular. O uso de nutlin-3, molécula inibidora da interação *MDM4-p53*, tem mostrado destruir eficientemente as células tumorais de retinoblastoma (LAURIE et al. 2006). Já o gene *PI3KC2B*, variante da família de PI3K, apresenta-se amplificado em glioblastomas (VAN DEN BOOM et al. 2003), e, possui um importante papel na via de sinalização PI3K/AKT, regulando um grande número de processos celulares, tais como: crescimento e proliferação, apoptose, migração, invasão e angiogênese (KNOBBE et al. 2005).

As análises do número de cópias gênicas dos genes recém citados acima, foram feitas em conjunto de duas sondas distintas, uma que cobriu os genes *KIF14* e *DDX59*, e outra que cobriu os genes *MDM4* e *PIK3C2B*, com os dados retirados da biblioteca virtual para a confecção dessas sondas

caseiras para iFISH - *UCSC Genome Browser*. Ressaltamos ainda, a importância da alteração genética dos genes *DDX59* e *PIK3C2B* que, embora hajam poucos relatos na literatura, eles pertencem à família de proteínas com importantes funções biológicas. Um estudo anterior identificou uma co-amplificação de *MDM4* e *PIK3C2B* em uma de quatro amostras de hepatoblastoma (ARAI et al. 2010), outros autores reportaram esses genes amplificados em muitos tumores, incluindo carcinomas e retinoblastoma, mas sem relatos anteriores sobre os tumores de Ewing (ZIELENSKA et al. 2005; SCHLAEGER et al. 2008).

Na análise da região 16q21, encontramos alterações do número de cópias gênicas em 20.9% dos casos. Dos quais, 9.6% mostraram somente deleção por hemizigose, enquanto que, 11.3% dos casos mostram ganhos dessa região. Estudos prévios usando métodos de DNA *array* e de FISH mostraram alterações genéticas na região do cromossomo 16q em 21% (HATTINGER et al. 2002; MARCHONG et al. 2004).

A deleção vista em nosso estudo envolveu somente um dos homólogos do cromossomo 16, implicando que a outra cromátide pode estar inativa, por uma segunda mutação em ponto ou um rearranjo, ou, ainda, por *imprinting* genômico (MARCHONG et al. 2004).

Nosso gene-alvo nessa região do cromossomo 16 (16q21-1q22.1) que, de acordo com a literatura, é considerado foco de genes supressores tumorais, ainda não identificados. Para análise de citogenética molecular pelo método de iFISH, focamos no locus do gene com proeminente importância na osteogênese, – caderina 11 ou *CDH11*. A proteína do gene

Caderina 11 ou osteoblástica, é expressa durante o desenvolvimento embrionário em células mesenquimais (OHALI et al. 2004), e, em câncer, parece estar envolvida no processo de invasão e metástase (PIERGA et al. 2006). Além disso, ela aparece pouco expressa em estruturas diferenciadas, mas altamente expressa em rhabdomyosarcoma (MARKUS et al. 1999) e em tumor de Wilms (SCHULZ et al. 2000).

Conforme os nossos resultados, ganhos do gene *CDH11* em TE foram concordantes com outros estudos publicados (OHALI et al. 2004; HULLIESKOVAN et al. 2005). Nossos resultados mostraram uma associação estatisticamente significativa entre as deleções da região 16q e ganhos da região 1q, sugerindo uma interação genética devido a troca de segmentos cromossômicos entre eles, como já mencionado anteriormente (DOUGLASS et al. 1990; HATTINGER et al. 2002). Supondo a ocorrência de uma translocação não balanceada $t(1;16)$ em 21% dos pacientes com TE. No cromossomo 16, o segmento 16q21-16q22.1 é uma região onde reside um grupo de genes das família das caderinas (*CDH 1, 3, 5, 8 e 16*), indicando uma região de complexa interpretação, já que o papel desses genes pode estar intrinsecamente relacionado. Ademais, o resultado do efeito da dosagem desses genes no tumor, pode estar modificado simultaneamente, conferindo características biopatológicas peculiares a um certo grupo de amostras (STARK et al. 1997).

No entanto, ainda é obscuro se a translocação cromossômica que envolve os cromossomos 1 e 16 é resultado dos genes que residem nesse local, individualmente, ou do rearranjo com outros genes supressores

tumorais, mas, potencialmente, essa alteração levaria à uma vantagem seletiva no crescimento desordenado de clones malignos em diversos tumores.

Em relação às aneussomias dos cromossomos 7, 8, e 12, alterações foram encontradas em 9.7%, 21.8% e 14.5% dos casos estudados, respectivamente. O número de cópias do cromossomo 7, correlaciona-se em muitos modelos neoplásicos com o grau de diferenciação e com o aumento da proliferação celular (WALDMAN et al. 1991). A trissomia deste cromossomo está frequentemente associada a um evento tardio no processo da carcinogênese, como sugerido por AMIEL et al. (2003). A alteração no cromossomo 8 também foi estudada anteriormente (MAURICI et al. 1998; ZIELENSKA et al. 2001), os quais apresentam a mesma proporção de alterações numéricas encontradas neste estudo, mas vistos por outras técnicas citogenéticas, afora a técnica de iFISH. De acordo com os nossos achados, as aberrações genéticas frequentemente vistas foram as trissomias dos cromossomos 8 e/ ou 12, as quais estão em consonância com resultados previamente encontrados, apresentando 83% de frequência em recorrência para o cromossomo 8 e 47% e tumores primários para o cromossomo 12, e, portanto, associadas a um comportamento biológico mais agressivo (MAURICI et al. 1998; ZIELENSKA et al. 2001; AMIEL et al. 2003). No entanto, nossos resultados mostraram que as aberrações desses cromossomos foram encontradas com maior frequência em tumores primários do que em metastáticos, porém, é preciso levar em conta a desproporcionalidade do tipo de material analisado nos estudos, o que

geralmente não é relatado. A aneuploidia do cromossomo 12 parece ser um evento genético comum para os pacientes com tumores de Ewing, embora menos frequente do que o cromossomo 8, mas também, supõem-se o seu envolvimento no prognóstico desses pacientes. Ainda há controversias sobre a presença concomitante dessas duas alterações, sugerindo-se serem eventos genéticos dependentes por uns autores (ARMENGOL et al. 1997), enquanto para outros, são processos independentes durante a tumorigênese (MAURICI et al.1998).

Segundo MAURICI et al. (1998), a aneuploidia desses cromossomos ocorre com maior frequência em recorrência local do que em tumores primários e metastáticos, no entanto, outros estudos afirmam uma maior frequência em fenótipos metastáticos, logo, predizendo um pior prognóstico (THORNER e SQUIRE 1998, ZIELENSKA et al. 2001). A falta de coerência entre as análises encontradas na literatura, leva-nos à hipótese de que as alterações do número de cópias dos cromossomos 8 e 12 ocorrem desproporcionalmente nas etapas de progressão dos tumores de Ewing.

As interações genéticas encontradas entre as aberrações dos cromossomos 7, 8 e 12, principalmente, entre os cromossomos 8 e 12, sugerem que, entre eles, há um mecanismo comum de aneuploidia envolvida no processo de progressão dessa doença. Para esclarecermos mais a esse respeito, executamos análises *in silico* através de banco de dados e programas de computador, Progenetix e Nexus 5.0, as quais nos possibilitaram analisar os genes que residem nesses cromossomos. Encontramos altas taxas de amplificação ao longo dos cromossomos 7 e 8,

que sugerem ocorrer devido à presença de importantes oncogenes, potencialmente envolvidos no desenvolvimento e na progressão de TE, são eles: *EGFR* (7p11.2), *MYC* (8q24), *GLI1* (12q13.3), *MDM2* (12q15) e *CDK4* (12q14.1), e também conhecidos com altos níveis de expressão em TE (MCKEON et al. 1988; LADANYI et al. 1995; ARMENGOL et al. 1997; FERREIRA et al. 2008).

Além disso, esses resultados mostraram concordância com outros achados da literatura. Análises pela técnica de CGH, mostraram ganhos do cromossomo 8 e 12 previamente encontrados em osteossarcomas (TARKKANEN et al. 1995) e em outros sarcomas de partes moles (SUIJKERBUIJK et al. 1994; FORUS et al. 1995; SZYMANSKA et al. 1996).

Análises univariadas mostraram as características clínico-patológicas - idade e recorrência tumoral-, estatisticamente associadas com sobrevida global (SG), mas não com sobrevida livre de evento (SLE). Pacientes com idade inferior a 15 anos mostraram maiores taxas de sobrevida global do que os com idade superior. Esses dados são concordantes com resultados de PICCI et al. (1996) e FIZAZI et al. (1998) que confirmaram através de análises multivariadas pacientes com idade inferior a 15 anos apresentaram prognóstico favorável, porém, é ainda um dado controverso na literatura. Em relação aos pacientes que apresentaram recorrência tumoral, é sabido que 30% a 40% dos pacientes com TE localizado, recorrem (McTIERNAN et al. 2006), os quais apresentam sobrevida global em 5 anos de 13% (BACCI et al. 2004).

Entre os parâmetros genéticos, análises estatísticas revelaram que pacientes afetados pela fusão *EWSR1-FLI1* apresentaram melhor SG, dado esse controverso na literatura. Essa fusão *EWSR1-FLI1* está presente somente nas células de TE e não existe em nenhuma célula normal do corpo (UREN et al. 2004), implicando importância na sobrevivência do tumor, mas sem associação com o prognóstico do paciente comprovada.

Através dos nossos resultados acima citados, a região 1q32.1 foi associada com prognóstico ruim em pacientes com TE. Pacientes que apresentaram ganhos dessa região mostraram mais chances de recaída tumoral. Estudos recentes de análises da expressão gênica de *KIF14* mostraram sua alta expressão associada com prognóstico ruim em pacientes com tumores de pulmão, mama (CORSON et al. 2007), retinoblastoma (MADHAVAN et al. 2007) e laringe (MARKOWSKI et al. 2009). Desta forma, podemos pensar que, em TE, esse gene é também um forte candidato envolvido na progressão tumoral e, portanto, um indicador de prognóstico desfavorável. A recente identificação de *KIF14* como um candidato a oncogene cresce quando a sua expressão encontra-se relacionada com defeitos na citocinese, levando ao aumento da instabilidade genética, por aneuploidia (GRUNEBERG et al. 2006). Além disso, ganhos dos genes *MDM4* e *PIK3C2B* nessa região, podem ter papel relevante na progressão de TE. Recentemente, esses genes têm sido reportados como importantes alvos para drogas anticâncer (TRAER et al. 2006; TOLEDO e WAHL 2007; VALENTIN-VEGA et al. 2007; LAM et al. 2010), indicando que o locus 1q32.1 é uma região significativa para tratar pacientes com TE

resistente à quimioterapia e que apresentam ganho/amplificação dessa região.

Uma associação estatisticamente significativa também foi encontrada entre *CDH11* e recaída tumoral. Em estudos prévios, ganhos do número de cópias e presença da expressão proteica desse gene mostraram associação com o processo metastático em osteossarcoma (OHALI et al. 2004, KASHIMA et al. 1999). Pacientes que apresentaram ganhos de *CDH11*, e mostraram piores taxas de sobrevida livre de evento do que paciente que apresentaram deleção por hemizigose desse gene. O grupo de pacientes com hemizigose também apresentou prognóstico ruim, como apresentado em outros estudos de RT-PCR em osteossarcoma (NIKAJIMA et al. 2008). Tumores originados de células mesenquimais têm N-caderina e E-caderina presentes em suas células epiteliais (OHALI et al. 2004), portanto, uma baixa expressão delas, com uma alta expressão de *CDH11* podem facilitar o processo de invasão das células tumorais. Recentes dados de análise de cDNA *microarray* mostraram associação de altos níveis de *CDH11* com prognóstico ruim para pacientes com TE (OHALI et al. 2004), permitindo uma clara segregação entre pacientes com alto e baixo risco de recorrência.

Ainda no presente estudo, pacientes que mostraram ganhos dos cromossomos 7, 8 e 12 apresentaram melhores taxas de SG que aqueles que não apresentaram tais aberrações. Um estudo anterior encontrado na literatura (ZIELENSKA et al. 2001), embora concordante com nossos achados, supõe que a presença de ganhos do cromossomo 8 não é indicativo de bom prognóstico para pacientes com TE, pois múltiplas

alterações numéricas e estruturais com outros cromossomos podem ser responsáveis por um prognóstico ruim. Interessantemente, nesse estudo, encontramos que paciente com aumento numérico dos cromossomos 8 e 12 (n=12) concomitantemente, apresentaram melhor prognóstico em relação à sobrevida global do que pacientes que não mostraram essas anormalidades genéticas. Todavia, pacientes com ganhos do gene *CDH11* e ganhos do cromossomo 12 apresentaram mais chances de recorrência do que o restante da população estudada. Resultados publicados anteriormente, sugerem que tumores que apresentam ganhos do cromossomo 12 têm a tendência de adquirir alterações genéticas estruturais envolvendo os braços longos dos cromossomos 1 e 16, as quais acreditam-se ocorrerem posteriormente às aberrações numéricas (TARKKANEN et al. 1995; HATTINGER et al. 2002). É interessante notar em nossos dados que, a maioria dos pacientes com ganhos de *CDH11* também apresentaram ganhos do cromossomo 12, indicando que essa interação pode ser um evento tardio na tumorigênese dos TE. Além disso, tem sido amplamente descrito que cariótipos complexos tendem ser associados a ganhos do cromossomo 12 (ZIELENSKA et al. 2001; BRASELMANN et al. 2005; IMPERA et al. 2008). Diante disso, parece que o grupo de pacientes que carrega ganhos de *CDH11* possuem uma rede de interações gênicas com o cromossomo 12. Essa interação, talvez, seja devido à presença de regiões de DNA homólogas a esses cromossomos, as quais causam um intrincado cenário genético, e, conseqüentemente, uma doença com fenótipo agressivo. Dessa forma, tanto ganhos da região 1q32.1, quanto da região

16q21-16q22.1 podem ser promissores marcadores genéticos para estratificar pacientes com risco de recorrência.

Quanto às células que apresentaram aumento simultâneo no número de cópias dos cromossomos nesses tumores, não podemos descartar a possibilidade de serem um reflexo da poliploidização do tumor, e considerar somente a existência de anomalias cromossômicas específicas desses tipos de tumores. Este número crescente de alterações cromossômicas e, logo, do conteúdo de DNA sugere que, na transformação maligna e na progressão tumoral, a instabilidade genômica é um fator importante.

O conteúdo de DNA das células ou o número de ploidia, talvez seja, um dos marcadores genéticos mais simples, porém, ainda pouco conhecido. Tumores diplóides são associados com prognóstico ruim, enquanto que a hiperploidia, e, em especial, a triploidia, é associada com bom prognóstico (THORNER e SQUIRE 1998). O mecanismo em que um tumor diploide se baseia para desenvolver um prognóstico desfavorável, é ainda desconhecido. Contudo, nosso estudo sugere que alterações genéticas em 1q32.1 podem ser responsáveis pela perda do controle da segregação cromossômica durante citocinese, permitindo a aquisição de células com aneuploidias e que podem conferir vantagens seletivas de crescimento tumoral.

Vale ainda realçar que, uma associação estatisticamente significativa não foi encontrada entre os grupos de pacientes tratados ou não tratados e as alterações genéticas. Alguns estudos sugerem a existência de aumento da instabilidade cromossômica após tratamento quimioterápico, com

subsequente formação de um segundo tumor primário. Porém, na casuística do presente estudo, casos com segundo tumor primário foram excluídos do estudo, o que permitiu uma análise estatística mais consistente. Um estudo de análises genômicas em larga escala de 56 casos de hepatoblastomas (ARAI et al. 2010), também mostrou não haver influência da quimioterapia neo-adjuvante na incidência das alterações genéticas e epigenéticas. Portanto, acreditamos que tratamentos neo-adjuvantes, com várias drogas quimioterápicas podem alterar, mais significativamente, o sistema imunológico do que o próprio genoma do paciente.

Análises multivariadas de regressão de COX mostraram que as alterações genéticas *EWSR1/FLI1* e ganhos do cromossomo 8 se mantiveram como fatores prognóstico de doença favorável. Por outro lado, essas análises confirmaram ganhos do número de cópias gênica das regiões, 1q32.1 e 16q21-16q22.1, como fatores prognósticos independentes de evolução desfavorável da doença. Pacientes com tais alterações apresentaram risco de aproximadamente três vezes a mais de recaída do que pacientes que não possuíam tais alterações. Da mesma forma, ganhos do cromossomo 12 juntamente com ganhos de 16q21, são potenciais fatores genéticos para predizer o prognóstico de pacientes com TE, apresentando aproximadamente quatro vezes mais risco de sofrer recaída do que os outros pacientes sem essas alterações. Portanto, pacientes que apresentam ganhos de 1q32.1 ou 16q21-16q22.1 tendem a sofrer recaída, sugerindo essas alterações como potenciais novos marcadores genéticos para

predizer uma doença mais agressiva, podendo, assim, estratificar pacientes para terapias mais personalizadas.

7 CONCLUSÕES

No presente estudo, as análises de alteração do número de cópias gênicas aqui estudadas, em 132 pacientes, revelaram significantes regiões de anomalias genéticas em tumores de Ewing, sugerindo envolvimento de genes supressores de tumor e/ou oncogenes na tumorigênese dessa doença. Aqui, ressaltamos algumas conclusões deste trabalho:

- 1) Ganho no número de cópias dos genes *KIF14*, *DDX59*, *MDM4* e *PI3KC2 β* (1q32.1) - potenciais oncogenes, e *CDH11* (16q21-q22) - supressor de tumor, mostrou associação estatisticamente significativa com recaída tumoral, conferindo um comportamento mais agressivo. Logo, apresentando-se como um importante valor prognóstico de recaída para pacientes com doença localizada de TE;
- 2) A interação genética entre ganho do *CDH11* e trissomia do cromossomo 12 estratifica pacientes com pior prognóstico;
- 3) A trissomia dos cromossomos 7 ou/e 8 ou/e 12 estratifica pacientes com melhor prognóstico;
- 4) Distintas vias de sinalização podem estar ativadas e importantes genes podem estar alterados, levando a um complexo mecanismo molecular de crescimento e agressividade dos tumores de Ewing.

Além do rearranjo de 22q12 estar envolvido no desenvolvimento do TE, alterações genéticas adicionais a essa alteração são necessárias para levar à progressão de uma doença mais agressiva. A estratificação de

pacientes com risco de recaída tumoral, pelos genes aqui estudados pela técnica de iFISH, pode revelar valiosos fatores genéticos de prognóstico, podendo ser aplicados desde o momento do diagnóstico. E, em um futuro próximo, quando os valores precisos desses genes e de seus produtos forem verificados, através de mais estudos multi-institucionais na tumorigênese dos TE, novas terapias-alvos poderão surgir para melhorar a sobrevida desses pacientes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou Youssif T, Fahmy MA, Koumakpayi IH, et al. The mammalian target of rapamycin pathway is widely activated without PTEN deletion in renal cell carcinoma metastases. **Cancer** 2011; 117:290-300.

Amiel A, Ohali A, Fejgin M, et al. Molecular cytogenetic parameters in Ewing sarcoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 140:107-12.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43:55-60.

Arai Y, Honda S, Haruta M, et al. Genome-wide analysis of allelic imbalances reveals 4q deletions as a poor prognostic factor and MDM4 amplification at 1q32.1 in hepatoblastoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:596-609.

Armengol G, Tarkkanen M, Virolainen M, et al. Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. **Br J Cancer** 1997; 75:1403-9.

Bacci G, Forni C, Longhi A, et al. Long-term outcome for patients with non-metastatic Ewing's sarcoma treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapies. 402 patients treated at Rizzoli between 1972 and 1992. **Eur J Cancer** 2004; 40:73-83.

Baudis M, Cleary ML. Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. **Bioinformatics** 2001; 17:1228-9.

Baudis M. **Progenetix oncogenomic online resource**. 2009. Available from: <URL:www.progenetix.net> [2011 maio 12].

Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, et al. Ewing sarcoma family of tumors: Ewing sarcoma of bone and soft tissue and the peripheral primitive neuroectodermal tumors. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. **Principles and practice of pediatric oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 35: p.1003-32.

Bertolotti A, Lutz Y, Heard DJ, Chambon P, Tora L. Htaf (II) 68, a novel RNA/ssDBA-binding protein with homology to the pro-oncoproteins *TLS/FUS* and *EWS* is associated with both TFIID and RNA polymerase II. **EMBO J** 1996; 15:5022-31.

Betts DR, Avoledo P, von der Weid N, Greiner J, Niggli FK. Cytogenetic characterization of Ewing tumors with high-ploidy. **Cancer Genet Cytogenet**. 2005; 159:160-3.

Blaschke S, Mueller CA, Markovic-Lipkovski J, et al. Expression of cadherin-8 in renal cell carcinoma and fetal kidney. **Int J Cancer** 2002; 101:327-34.

Boormans JL, Korsten H, Ziel-van der Made AC, van Leenders GJ, Verhagen PC, Trapman J. E17K substitution in AKT1 in prostate cancer. **Br J Cancer** 2010; 102:1491-4.

Braselmann H, Kulka U, Baumgartner A, et al. SKY and FISH analysis of radiation-induced chromosome aberrations: a comparison of whole and partial genome analysis. **Mutat Res** 2005; 578:124-33.

Brown LA, Huntsman D. Fluorescent in situ hybridization on tissue microarrays: challenges and solutions. **J Mol Hist** 2007; 38:151-7.

Burchill SA. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. **J Clin Pathol** 2003; 56:96-102.

Cahill DP, Lengauer C, Yu J, et al. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. **Nature** 1998; 392:300-3.

Corson TW, Huang A, Tsao MS, Gallie BL. KIF14 is a candidate oncogene in the 1q minimal region of genomic gain in multiple cancers. **Oncogene** 2005; 24:4741-53.

Corson TW, Zhu CQ, Lau SK, Shepherd FA, Tsao MS, Gallie BL. KIF14 messenger RNA expression is independently prognostic for outcome in lung cancer. **Clin Cancer Res** 2007; 13:3229-34.

Costa CML, Rondinelli P, Campbell B. Tumor neuroectodérmico primitivo da infância: relato de 13 casos e revisão de literatura. **J Oncol** 2000; 46:293-8.

Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, et al. Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. **J Clin Oncol** 2000; 18:3108-14.

de Alava E, Antonescu CR, Panizo A. Prognostic impact of p53 status in Ewing sarcoma. **Cancer** 2000a; 89:783-92.

de Alava E, Panizo A, Antonescu CR, et al. Association transactivation by alternative EWS-FLI1 type 1 fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. **Am J Pathol** 2000b; 156: 849-55.

Delattre O, Zucman J, Plougastel B, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. **Nature** 1992; 359:162-5.

Delattre O, Zucman J, Melot T, et al. The Ewing family of tumors – a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. **N Engl J Med** 1994; 331:294-9.

Delattre O. Ewing's tumours, genetic and cellular aspects. **Pathol Biol (Paris)** 2008; 56:257-9.

Desmaze C, Zucman J, Delattre O, Melot T, Thomas G, Aurias A. Interphase molecular cytogenetics of Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma t(11,22) with flanking and overlapping cosmid probes. **Cancer Genet Cytogenet** 1994; 74:13-8.

Dorey FJ, Korn EL. Effective sample sizes for confidence intervals for survival probabilities. **Stat Med** 1987; 6:679-87.

Douglass EC, Rowe ST, Valentine M, Parham D, Meyer WH, Thompson EI. A second nonrandom translocation, der(16)t(1,16)(q21,q13), in Ewing sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor. **Cytogenet Cell Genet** 1990; 53:87-90.

Dracopoli NC. Current protocols in human genetics. In: Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, et al. editors. **Cytogenetics**. New York: John Wiley & Sons; 2001. p.22-35.

Dracopoli NC. Development of oncology drug response markers using transcription profiling. **Curr Mol Med** 2005; 5:103-10.

Embree LJ, Azuma M, Hickstein DD. Ewing sarcoma fusion protein EWSR1/FLI1 interacts with EWSR1 leading to mitotic defects in zebrafish embryos and human cell lines. **Cancer Res** 2009; 69:4363-71.

Ewing J. The classic: diffuse endothelioma of the bone. Proceedings of the New York Pathological Society. 1921;12:17. **Clin Orthop Relat Res** 2006; 450:25-7.

Fagioli F, Cuneo A, Bardi A, et al. Heterogeneity of lineage involvement by trisomy 8 in myelodysplastic syndrome: a multiparameter analysis combining conventional cytogenetics, DNA in situ hybridization, and bone marrow culture studies. **Cancer Genet Cytogenet** 1995; 82:116-22.

Ferreira BI, Alonso J, Carrillo J, et al. Array CGH and gene-expression profiling reveals distinct genomic instability patterns associated with DNA repair and cell-cycle checkpoint pathways in Ewing's sarcoma. **Oncogene** 2008; 27:2084-90.

Fizazi K, Dohollou N, Blay JY, et al. Ewing's family of tumors in adults: multivariate analysis of survival and long-term results of multimodality therapy in 182 patients. **J Clin Oncol** 1998; 16:3736-43.

Forus A, Weghuis DO, Smeets D, Fodstad O, Myklebost O, van Kessel AG Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas. I. Occurrence of genomic imbalances and identification of a novel major amplicon at 1q21-q22 in soft tissue sarcomas. **Genes Chromosomes Cancer** 2005; 14:8-14.

Foster K, Wang Y, Zhou D, Wright C. Dependence on PI3K/Akt signaling for malignant rhabdoid tumor cell survival. **Cancer Chemother Pharmacol** 2009; 63:783-91.

Grier HE. The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. **Pediatr Clin North Am** 1997; 44:991-1004.

Gruneberg U, Neef R, Li X, Chan EH, Chalamalasetty RB, Nigg EA, Barr FA. KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. **J Cell Biol** 2006; 172:363-72.

Grundy PE, Telzerow PE, Breslow N, Moksness J, Huff V, Paterson MC. Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. **Cancer Res** 1994; 54:2331-3.

Hattinger CM, Rumpler S, Ambros IM, et al. Demonstration of the translocation der(16)t(1,16)(q12,q11.2) in interphase nuclei of Ewing tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 1996; 17:141-50.

Hattinger CM, Rumpler S, Strehl S, et al. Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 1999; 24:243-54.

Hattinger CM, Potschger U, Tarkkanen M, et al. Prognostic impact of chromosomal aberrations in Ewing Tumors. **Br J Cancer** 2002; 86:1763-9.

Horowitz ME, Tsokos MG, DeLaney TF. Ewing's sarcoma. **CA Cancer J Clin** 1992; 42:300-20.

Hu-Lieskovan S, Zhang J, Wu L, et al: EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors. **Cancer Res** 2005; 65:4633-44.

Impera L, Albano F, Mancini M, Aventin A, Rocchi M, Storlazzi CT. Similar mechanisms formed ring markers containing chromosome 12 pericentromeric region in two patients with therapy-related acute myeloid leukemia. **Cancer Genet Cytogenet** 2008; 181:131-7.

Janknecht R. EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing Tumors. **Gene** 2005; 363:1-14.

Jürgens H, Exner U, Gadner H, et al. Multidisciplinary treatment of primary Ewing's sarcoma of bone: a 6-year experience of a European Cooperative Trial. **Cancer** 1988; 61:23-32.

Jürgens H Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermaltumor. **Curr Opin Oncol** 1994; 6:391-6.

Kawai T, Hiroi S, Nakanishi K, Sakurai Y, Torikata C. Abnormalities in chromosome 17 and p53 in lung carcinoma cells detected by fluorescence in situ hybridization. **Pathol Int** 2004; 54:413-9.

Ko E, Rademaker A, Martin R. Microwave decondensation and codenaturation: a new methodology to maximize FISH data from donors with very low concentrations of sperm. **Cytogenet Cell Genet** 2001; 95:143-5.

Khoury JD. Ewing Sarcoma Family of Tumors. **Adv Anat Pathol** 2005; 12:212-20.

Knobbe CB, Trampe-Kieslich A, Reifenberger G. Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2005; 31:486-90. Erratum in: **Neuropathol Appl Neurobiol** 2005; 31:662.

Korshunov A, Sycheva R, Gorelyshev S, Golanov A. Clinical utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) in nonbrainstem glioblastomas of childhood. **Mod Pathol** 2005;18:1258-63.

Koscielniak E, Jurgens H, Winkler K, et al. Treatment of soft tissue sarcoma in childhood and adolescence: a report of the German Cooperative Soft Tissue Sarcoma Study. **Cancer** 1992; 70:2557-67.

Kosyakova N, Weise A, Mrasek K, Claussen U, Liehr T, Nelle H. The hierarchically organized splitting of chromosomal bands for all human chromosomes. **Mol Cytogenet** 2009; 2:4.

Kovar H, Jug G, Aryee DNT, et al. Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. **Oncogene** 1997; 15:2225-32.

Kovar H. Downstream EWS/FLI1 - upstream Ewing's sarcoma. **Genome Med** 2010; 2:8.

Kremmidiotis G, Baker E, Crawford J, Eyre HJ, Nahmias J, Callen DF. Localization of human cadherin genes to chromosome regions exhibiting cancer-related loss of heterozygosity. **Genomics** 1998; 49:467-71.

Kullendorff CM, Mertens F, Donner M, Wiebe T, Akerman M, Mandahl N. Cytogenetic aberrations in Ewing sarcoma: are secondary changes associated with clinical outcome? **Med Pediatr Oncol** 1999; 32:79-83.

Ladanyi M, Lewis R, Jhanwar SC, Gerald W, Huvos AG, Healey JH. MDM2 and CDK4 gene amplification in Ewing's sarcoma. **J Pathol** 1995; 175:211-7.

Lahl M, Fisher VL, Laschinger K. Ewing's sarcoma family of tumors: an overview from diagnosis to survivorship. **Clin J Oncol Nurs** 2008; 12:89-97.

Lam S, Lodder K, Teunisse AF, Rabelink MJ, Schutte M, Jochemsen AG. Role of Mdm4 in drug sensitivity of breast cancer cells. **Oncogene** 2010; 29:2415-26.

Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, et al. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. **Nature** 2006; 444:61-6.

Lazar A, Abruzzo LV, Pollock RE, Lee S, Czerniak B. Molecular diagnosis of sarcomas: chromosomal translocations in sarcomas. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:1199-207.

Le Deley MC, Delattre O, Schaefer KL, et al: Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. **J Clin Oncol** 2010; 28:1982-8.

Li H, Gao Q, Guo L, Lu SH. The PTEN/PI3K/Akt pathway regulates stem-like cells in primary esophageal carcinoma cells. **Cancer Biol Ther** 2011; 11:950-8.

Madhavan J, Coral K, Mallikarjuna K, et al. High expression of KIF14 in retinoblastoma: association with older age at diagnosis. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2007; 48:4901-6.

Maire G, Brown CW, Bayani J, et al. Complex rearrangement of chromosomes 19, 21, and 22 in Ewing sarcoma involving a novel reciprocal inversion-insertion mechanism of EWS-ERG fusion gene formation: a case analysis and literature review. **Cancer Genet Cytogenet.** 2008; 181:81-92.

Maire G, Yoshimoto M, Chilton-MacNeill S, Thorner PS, Zielenska M, Squire JA. Recurrent RECQL4 imbalance and increased gene expression levels are associated with structural chromosomal instability in sporadic osteosarcoma. **Neoplasia** 2009; 11:260-8, 3p following 268.

Marchong MN, Chen D, Corson TW, et al. Minimal 16q genomic loss implicates cadherin-11 in retinoblastoma. **Mol Cancer Res** 2004; 2:495-503.

Markowski J, Tyszkiewicz T, Jarzab M, et al. Metal-proteinase ADAM12, kinesin 14 and checkpoint suppressor 1 as new molecular markers of laryngeal carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2009; 266:1501-7.

Markus MA, Reichmuth C, Atkinson MJ, et al: Cadherin-11 is highly expressed in rhabdomyosarcomas and during differentiation of myoblasts in vitro. **J Pathol** 1999; 187:164-72.

Maurici D, Perez-Atayde A, Grier HE, Baldini N, Serra M, Fletcher JA. Frequency and implications of chromosome 8 and 12 gains in Ewing sarcoma. **Cancer Genet Cytogenet** 1998; 100:106-10.

McKeon C, Thiele CJ, Ross RA, et al. Indistinguishable patterns of protooncogene expression in two distinct but closely related tumors: Ewing's sarcoma and neuroepithelioma. **Cancer Res** 1988; 48:4307-11.

McTiernan AM, Cassoni AM, Driver D, Michelagnoli MP, Kilby AM, Whelan JS. Improving outcomes after relapse in Ewing's sarcoma: analysis of 114 patients from a single institution. **Sarcoma** 2006; 2006:83548.

Merscher S, Marondel I, Pedeutour F, Gaudray P, Kucherlapati R, Turc-Carel C. Identification of new translocation breakpoints at 12q13 in lipomas. **Genomics** 1997; 46:70-7.

Mezzelani A, Alasio L, Bartoli C, et al. c-erbB2/neu gene and chromosome 17 analysis in breast cancer by FISH on archival cytological fine-needle aspirates. **Br J Cancer** 1999; 80:519-25.

Mhaweck-Fauceglia P, Herrmann F, Penetrante R, et al. Diagnostic utility of FLI-1 monoclonal antibody and dual-colour, break-apart probe fluorescence in situ (FISH) analysis in Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumour (EWS/PNET). A comparative study with CD99 and FLI-1 polyclonal antibodies. **Histopathology** 2006; 49:569-75.

Mitelman F. **ISCN an International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Basel; Karger; 1995.

Mitelman F, Johansson B, Mertens F. **Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer**. Available from: <URL:<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>> [2011 jun 15].

Morohoshi F, Arai K, Takahashi EI, Tanigami A, Ohki M. Cloning and mapping of a human RBP56 gene encoding a putative RNA binding protein similar to *FUS/TLS* and *EWS* proteins. **Genomics** 1996; 38:51-7.

Mugneret F, Lizard S, Aurias A, Turc-Carel C. Chromosomes in Ewing's sarcoma. II. Nonrandom additional changes, trisomy 8 and der(16)t(1,16). **Cancer Genet Cytogenet** 1988; 32:239-45.

Nakajima G, Patino-Garcia A, Bruheim S, et al. CDH11 expression is associated with survival in patients with osteosarcoma. **Cancer Genomics Proteomics** 2008; 5:37-42.

Ng TL, O'Sullivan MJ, Pallen CJ, et al. Ewing sarcoma with novel translocation t(2;16) producing an in-frame fusion of FUS and FEV. **J Mol Diagn** 2007; 9:437-40.

Ohali A, Avigad S, Zaizov R, et al. Prediction of high risk Ewing's sarcoma by gene expression profiling. **Oncogene** 2004; 23:8997-9006.

Pfeifer JD. **Tumors of soft tissue and bone**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. Molecular genetic testing in surgical pathology; p.186-231.

Picci P, Böhling T, Bacci G, et al. Chemotherapy-induced tumor necrosis as a prognostic factor in localized Ewing's sarcoma of the extremities. **J Clin Oncol** 1997; 15:1553-9.

Pierga JY, Reis-Filho JS, Cleator SJ, Microarray-based comparative genomic hybridisation of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. **Br J Cancer** 2007; 96:341-51.

Riemenschneider MJ, Knobbe CB, Reifenberger G. Refined mapping of 1q32 amplicons in malignant gliomas confirms MDM4 as the main amplification target. **Int J Cancer** 2003; 104:752-7.

Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. **Cancer J** 2001; 7:24-31.

Roberts P, Burchill SA, Brownhill S, et al. Ploidy and karyotype complexity are powerful prognostic indicators in the Ewing's sarcoma family of tumors: a study by the United Kingdom Cancer Cytogenetics and the Children's Cancer and Leukaemia Group. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:207-20.

Rossi E, Ubiali A, Balzarini P, Cadei M, Alpi F, Grigolatoi PG. High-level detection of gene amplification and chromosome aneuploidy in extracted nuclei from paraffin-embedded tissue of human cancer using FISH: a new approach for retrospective studies. **Eur J Histochem** 2005; 49:53-8.

Sandberg AA, Bridge JA. Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 123:1-26.

Savola S, Klami A, Tripathi A, et al. Combined use of expression and CGH arrays pinpoints novel candidate genes in Ewing sarcoma family of tumors. **BMC Cancer** 2009; 14:9:17.

Saxena R, Sait S, Mhawech-Fauceglia P. Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney: a case report diagnosed by immunohistochemical and molecular analysis. **Ann Diag Pathol** 2006; 10:363-6.

Schaefer KL, Eisenacher M, Braun Y, et al. Microarray analysis of Ewing's sarcoma family of tumours reveals characteristic gene expression signatures associated with metastasis and resistance to chemotherapy. **Eur J Cancer** 2008; 44:699-709.

Schlaeger C, Longerich T, Schiller C, et al. Etiology-dependent molecular mechanisms in human hepatocarcinogenesis. **Hepatology** 2008; 47:511-20.

Schulz S, Becker KF, Braungart E, et al. Molecular analysis of E-cadherin and cadherin-11 in Wilms' tumours. **J Pathol** 2000; 191:162-9.

Selvarajah S, Yoshimoto M, Prasad M, et al. Characterization of trisomy 8 in pediatric undifferentiated sarcomas using advanced molecular cytogenetic techniques. **Cancer Genet Cytogenet** 2007; 174:35-41.

Shing DC, McMullan DJ, Roberts P, et al. *FUS/ERG* gene fusions in Ewing's tumors. **Cancer Res** 2003; 63:4568-76.

Shvarts A, Steegenga WT, Riteco N, et al. MDMX: a novel p53-binding protein with some functional properties of MDM2. **EMBO J** 1996; 15:5349-57.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. **Science** 2006; 314:268-74.

Slater RM, Mannens MM. Cytogenetics and molecular genetics of Wilms' tumor of childhood. **Cancer Genet Cytogenet** 1992; 61:111-21.

Sorensen PH, Liu XF, Delattre O, et al. Reverse transcriptase PCR amplification of EWS/FLI-1 fusion transcripts as a diagnostic test for peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood. **Diagn Mol Pathol** 1993; 2:147-57.

Squire J, Gallie BL, Phillips RA. A detailed analysis of chromosomal changes in heritable and non-heritable retinoblastoma. **Hum Genet** 1985; 70:291-301.

Stark B, Mor C, Jeison M, et al. Additional chromosome 1q aberrations and der(16) t (1,16), correlation to the phenotypic expression and clinical behavior of the Ewing family of tumors. **J Neurooncol** 1997; 31:3-8.

Sugimura H. Detection of chromosome changes in pathology archives: an application of microwave-assisted fluoresce in situ hybridization to human carcinogenesis studies. **Carcinogenesis** 2008; 29:681-87.

Suijkerbuijk RF, Olde Weghuis DEM, Van Den Berg M, et al. Comparative genomic hybridization as a tool to define two distinct chromosome 12-derived amplification units in well-differentiated liposarcomas. **Genes Chrom Cancer** 1994; 9:292-5.

Szuhai K, Ljszenga M, Tanke HJ, et al. Detection and molecular cytogenetic characterization of a novel ring chromosome in a histological variant of Ewing sarcoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2007; 172:12-22.

Szymanska J, Mandahl N, Mertens F, Tarkkanen M, Karaharju E, Knuutila S. Ring chromosomes in parosteal osteosarcoma contain sequences from 2q13-15. A combined cytogenetic and comparative genomic hybridization study. **Genes Chrom Cancer** 1996; 16:31-4.

Tarkkanen M, Karhu R, Kallioniemi A, et al. Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization. **Cancer Res** 1995; 55:1334-8.

Tarkkanen M, Kiuru-Kuhlefelt S, Blomqvist C, et al. Clinical correlations of genetic changes by comparative genomic hybridization in Ewing sarcoma and related tumors. **Cancer Genet Cytogenet** 1999; 114:35-41.

Thorner PS, Squire JA. Molecular genetics in the diagnosis and prognosis of solid pediatric tumors. **Pediatr Dev Pathol** 1998; 1:337-65.

Toledo F, Wahl GM. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. **Int J Biochem Cell Biol** 2007; 39:1476-82.

Traer CJ, Foster FM, Abraham SM, Fry MJ. Are class II phosphoinositide 3-kinases potential targets for anticancer therapies? **Bull Cancer** 2006; 93:E53-8.

Trakhtenbrot L, Cohen N, Betts DR, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 17 and 17q region gains in neuroblastoma: are they secondary events? **Cancer Genet Cytogenet** 2002; 137:95-101.

Turc-Carel C, Philip I, Berger MP, Philip T, Lenoir GM. Chromosomal translocations in Ewing's sarcoma. **N Engl J Med** 1983; 309:497-8.

Uren A, Wolf V, Sun YF, et al. Wnt/frizzled signaling in Ewing sarcoma. **Pediatr Blood Cancer** 2004; 43:243-9.

Valentin-Vega YA, Barboza JA, Chau GP, El-Naggar AK, Lozano G. High levels of the p53 inhibitor MDM4 in head and neck squamous carcinomas. **Hum Pathol** 2007; 38:1553-62.

van den Boom J, Wolter M, Kuick R, et al. Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. **Am J Pathol** 2003; 163:1033-43.

Varella-Garcia M, Chen L, Zheng X, Yu L, Dixon D. Karyotypic characteristics of human uterine leiomyoma and myometrial cell lines following telomerase induction. **Cancer Genet Cytogenet** 2006; 170:71-5.

Varella-Garcia M, Diebold J, Eberhard DA, et al. EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. **J Clin Pathol** 2009; 62:970-7.

Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. **J Mol Diagn** 2006; 8:141-51.

Vivanco I, Palaskas N, Tran C, et al. Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN. **Cancer Cell** 2007; 11:555-69.

Waldman FM, Carroll PR, Kerschmann R, Cohen MB, Field FG, Mayall BH. Centromeric copy of chromosome 7 is strongly correlated with tumor grade and labeling index in human bladder cancer. **Cancer Res** 1991; 51:3807-13.

Wang L, Bhargava R, Zheng T, et al. Undifferentiated small round cell sarcomas with rare EWS gene fusions: identification of a novel EWS-SP3 fusion and of additional cases with the EWS-ETV1 and EWS-FEV fusions. **J Mol Diagn** 2007; 9:498-509.

Wei G, Antonescu CR, de Alava E, et al. Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. **Cancer** 2000; 89:793-9.

Weise A, Mrasek K, Kosyakova N, et al. ISH Probes derived from BACs, including Microwave treatment for better FISH results. In: Liehr T, editor. **Fluorescence in situ hybridization (FISH)**. New York: Springer Protocols; 2009. p.53-60.

Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T, Miser J, Douglass EC, Israel MA. Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma. **N Engl J Med** 1984; 311:584-5.

Wyandt HE, Chinnappan D, Ioannidou S, Salama M, O'Hara C. Fluorescence in situ hybridization to assess aneuploidy for chromosomes 7 and 8 in hematologic disorders. **Cancer Genet Cytogenet** 1998; 102:114-24.

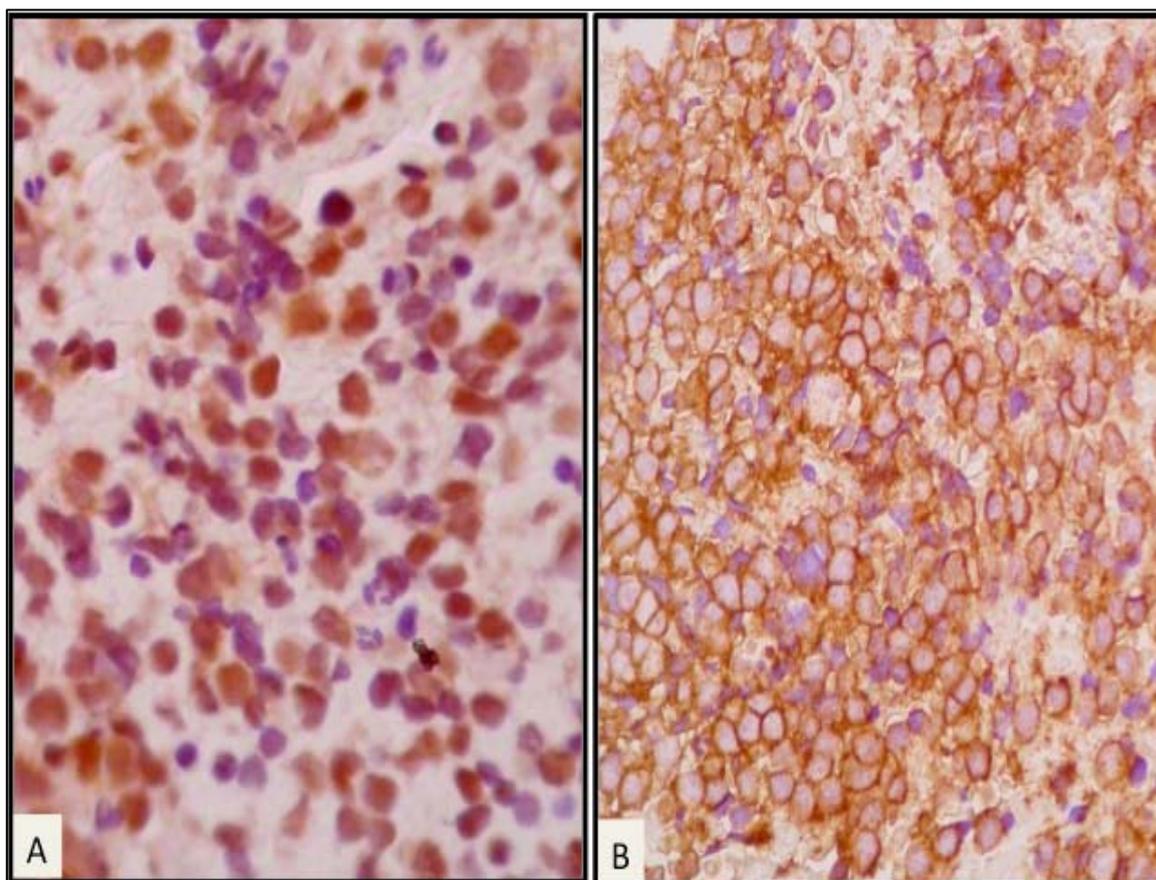
Zielenska M, Zhang ZM, Ng K, et al. Acquisition of secondary structural chromosomal changes in pediatric Ewing Sarcoma is a probable prognostic factor for tumor response and clinical outcome. **Cancer** 2001; 91:2156-64.

Zhou Z, Bolontrade MF, Reddy K, et al. Suppression of Ewing's sarcoma tumor growth, tumor vessel formation, and vasculogenesis following anti vascular endothelial growth factor receptor-2 therapy. **Clin Cancer Res** 2007; 13:4867-73.

Zoubek A, Dockhorn-Dworniczak B, Delattre O, et al. Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? **J Clin Oncol** 1996; 14:1245–51.

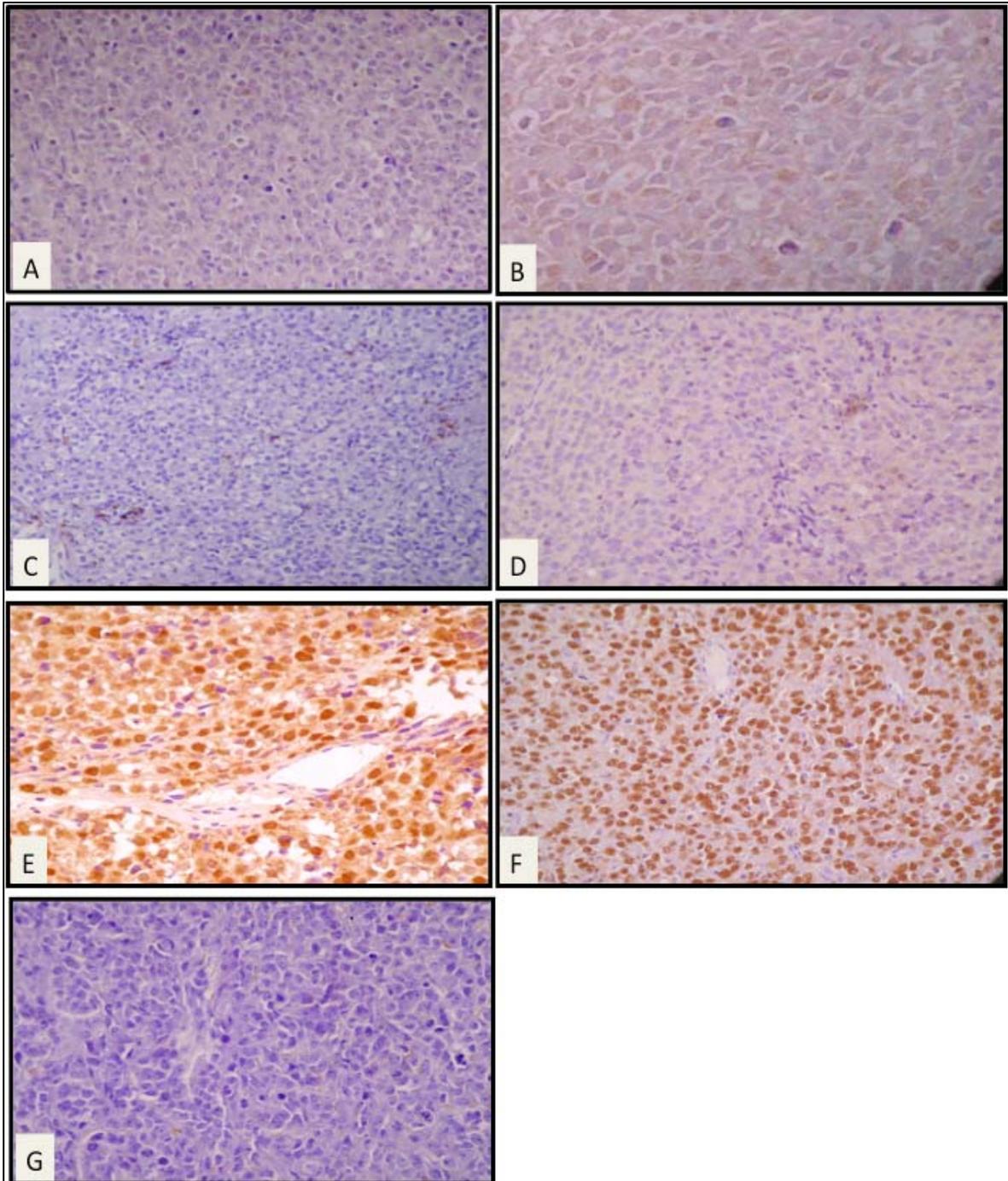
Zwerner JP, Joo J, Warner KL, et al. The EWS/FLI1 oncogenic transcription factor deregulates GLI1. **Oncogene** 2008; 27:3282-91.

Anexo 1 - Reação de imunistoquímica contra os anticorpos CD99 e FLI-1 aplicados em todos os casos do estudo para revisão histológica.



Legenda: A. células de tumor de Ewing/PNET mostrando expressão nuclear da proteína FLI-1. B. células de tumor de Ewing/PNET mostrando expressão de membrana da proteína CD99, 400x.

Anexo 2 - Reação de imunistoquímica contra a proteína FLI1, CD99, CD45, TDT, MYOD1, Miogenina e Desmina para checagem de diagnóstico diferencial.



Legenda: Células de rhabdomiossarcoma sem expressão para as proteínas: FLI1(A); 200x, CD99(B); 400x, CD45(C); 200x, TDT(D); 200x e Desmina(G); 200x. Células de rhabdomiossarcoma com expressão nuclear para as proteínas: MYOD1(E); 200x e Miogenina (F); 200x.

Anexo 3 - Anticorpos, métodos de recuperação antigênica, reagentes e controles positivos empregados nas reações de imunohistoquímica para confirmação do diagnóstico de tumor de Ewing/PNET.

Proteínas (Anticorpos)	Empresa	Anticorpo primário	Método de recuperação	Tampão de recuperação antigênica	Diluição do anticorpo primário	Bloqueio pós- primário	Polímero	Controle positivo
AE1/AE3	Dako	AE1 e AE3	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/1000	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Amígdala
AML	Dako	1A4	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/1600	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Leiomiossarcoma
CD03	Dako	f7.2.38	STEAMER	EDTA/TRIS; pH 9,0	1/200	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Timo
CD138	Dako	MI15	STEAMER	EDTA/TRIS; pH 9,0	1/600	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Melanoma
CD20	Dako	L26	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/2000	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Linfoma de Burkitt
CD31	Dako	Ber-H2	STEAMER	EDTA/TRIS; pH 9,0	1/300	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Angiossarcoma
CD34	Dako	QBEnd 10	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/2000	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Neurofibroma
CD45 (LCA)	Dako	PD7/26e2B11	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/3000	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Linfoma B
CD99	Dako	12E7	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/200	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Timo
CROMOGRANINA A	Dako	DAK-A3	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/200	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Neuroblastoma
DESMINA	Dako	DE-R-11	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/400	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Leiomiossarcoma
EMA	Dako	E29	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/4000	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Amígdala
FLI-1	Neomarkers	Policlonal	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/400	Post Primary Block (Novocastra)	Polymer (Novocastra)	Amígdala
HMB 45	Dako	Hmb45	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/200	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Melanoma

Proteínas (Anticorpos)	Empresa	Anticorpo primário	Método de recuperação	Tampão de recuperação antigênica	Diluição do anticorpo primário	Bloqueio pós- primário	Polímero	Controle positivo
MELAN A	Dako	A103	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/300	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Melanoma
MIOGENINA	Dako	F5D	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/400	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Rabdomiossarcoma
MUM1	Dako	MUM1p	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/500	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Linfoma de Hodgkin
MYOD1	Dako	5.8A	STEAMER	EDTA/TRIS; pH : 9,0	1/30	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Rabdomiossarcoma
P63	Dako	4A4	STEAMER	EDTA/TRIS; pH9,0	1/2000	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Próstata
S100	Dako	Policlonal	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/6000	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Melanoma
TDT	Bio SB, Inc.	Policlonal	STEAMER	EDTA/TRIS; pH9,0	1/3500	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Timo
TLE-1	Santa Cruz	Policlonal	STEAMER	EDTA; pH 8,0	1/200	Post Primary Block (Novocastra)	Polymer (Novocastra)	Sarcoma Sinovial
VIMENTINA	Dako	Vim 3B4	STEAMER	Citrato de Sódio 10 mM; pH 6,0	1/400	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Timo
WT1(C-119)-carboxi	Santa Cruz	Policlonal	STEAMER	EDTA; pH 8,0	1/50	Advance HRP Link (DAKO)	Advance HRP Link (DAKO)	Tumor de Wilms

Anexo 4 - Ficha de coleta de dados dos prontuários (Fundação Antônio Prudente – Hospital A. C. Camargo)

1 NÚMERO DO ESTUDO _____

2 PACIENTE _____

3 SEXO (1) Masculino (2) Feminino

4 RGH _____

5 IDADE _____

6 LOCAL _____ 1) extremidade inferior (fêmur, fíbula, tibia, ou pé) 44% (2) Pélvis (ílio, sacro, púbis, ou ísquio) 24% (3) extremidade superior (úmero, escápula, rádio, ulna, ou mão) 17% (4) tórax (rib, vértebra, clavícula, mandíbula, ou crânio) 15%

6 OSSEO (1)

EXTRAOSSEO (2)

OSSEO+EXTRAOSSEO (3)

(999, se desconhecido)

7 ADM DATA _____

8 IDADE _____

9 RAÇA (1) Branca (2) Amarela (3) Negra (4) Outra

10 QUEIXA

DOR (0) não (1) Local primário (2) Meta (3) Ambos

TUMORAÇÃO (0) não (1) sim

FEBRE (0) não (1) sim

PERDA DE PESO (0) não (1) sim

11 TEMPO DE DURAÇÃO DOS SINTOMAS (MESES) _____

12 META ao Dx (0) não (1) sim

13 Local meta (1) pulmão (2) ossos (3) medula óssea

14 STATUS (1) Intacto (2) Biopsiado (3) Operado (4) bx +QT (5) bx +RXT (6) bx +tto+ recidiva/META

15 HISTÓRIA FAMILIAR (0) não (2) sim

16 PARENTESCO _____

17 DOENÇA _____

BIÓPSIA DO TUMOR PRIMÁRIO:

18 AP _____

19 DATA _____

20 LOCAL _____ 1) extremidade inferior (fêmur, fíbula, tibia, ou pé) 44%(2) Pélvis (ílio, sacro, púbis, ou ísquio) 24% (3) extremidade superior (úmero, escápula, rádio, ulna, ou mão) 17% (3) tórax (rib, vértebra, clavícula, mandíbula, ou crânio) 15%

21 IDADE _____

22 DX _____

23 TAMANHO _____ MAIOR DIMENSAO _____ OUTRAS DIMENSOES _____

24 TTO (0) não (2) sim

25 DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO- _____

26 QT NEO (0) não (2) sim

27 DATA I _____

28 DATA F _____

29 DROGAS _____ (1) T11 (2) T11 MODIFICADO (3) OUTROS

30 RXT NEO (0) não (2) sim

31 DATA I _____

32 DATA F _____

33 CAMPOS

34 DOSES/RADS

35 RESPOSTA CLÍNICA A QT (1) TOTAL (2) PARCIAL (3) DOENÇA ESTÁVEL (4) PROGRESSÃO DA DOENÇA

(9) DESCONHECIDO

CONTROLE DO PRIMÁRIO

36 CIRURGIA DO TUMOR PRIMÁRIO (0) NÃO (1) SIM

37 TIPO DE CIRURGIA (1) CONSERVADORA (2) AMPUTAÇÃO

38 AP _____

39 DATA _____

40 IDADE _____

41 LOCAL/OSSEO _____ 1) extremidade inferior (fêmur, fíbula, tibia, ou pé) 44%(2) Pélvis (ílio, sacro, púbis, ou ísquio) 24% (3) extremidade superior (úmero, escápula, rádio, ulna, ou mão) 17% (3) tórax (rib, vértebra, clavícula, mandíbula, ou crânio) 15%

42 PM _____ (1) extensão (2) infiltração

43 DX _____ (0) SEM NEOPLASIA (1) PNET (3) OUTRA

44 Status margem CIRURGICA: (0) NAO (1) livres (2) comprometida (3) EXÍGUA < 2 CM

45 IV(0) não (1) sim

46 IPN(0) não (1) sim

47 IL(0) não (1) sim

48 RESPOSTA HISTOLÓGICA (NECROSE) (1) HUVOS I (2) HUVOS II (3) HUVOS III (4) HUVOS IV (5) PRESENTE (6) SEM NECROSE (999) NÃO DETERMINADO EXTENSÃO ESPECÍFICA ____%

49 TAMANHO (CM) MAIOR DIMENSÃO + _____ DIMENSÕES ADICIONAIS ____ (9) NÃO PODE SER DETERMINADA

50 QT ADJ (0) NÃO (1) SIM

51 DATA I _____

52 DATA F _____

53 DROGAS _____

54 RXT ADJ (0) não (2) sim

55 DATA I _____

56 DATA F _____

57 CAMPOS _____ 0) primário (1) meta (2) meta e primário _____

58 DOSES/RAD _____

59 DATA DO TÉRMINO DO TRATAMENTO: _____

60 QT DATA F _____

61 RXT DATA F _____

62 RECAÍDA DA DOENÇA

63 RECIDIVA 1 (0) não teve (1) local (2) recidiva, local ign. (9) ignorado-perdido de vista assintomático < 5 anos

64 CIRURGIA (0) não (1) sim

65 AP _____

66 DATA _____

67 IDADE _____

68 PM _____ (1) extensão (2) infiltração

69 DX _____

70 Status margem: (0) livre (1) comprometida (3) EXÍGUA < 2 CM

71 IV(1) AUSENTE (2) PRESENTE

72 IPN(1) AUSENTE (2) PRESENTE

73 IL(1) AUSENTE (2) PRESENTE

74 TAMANHO(CM) Maior dimensão _____ dimensões adicionais _____

75 (0) não pode ser determinada

76 RESPOSTA HISTOLÓGICA (NECROSE) (1) MÍNIMO (2) HUVOS I (3) HUVOS II (4) HUVOS IV (5) SEM NECROSE (6) AUSENTE (7) PRESENTE (9) NÃO DETERMINADO EXTENSÃO ESPECÍFICA ____%

77 TTO POS REC (0) não (1) sim

78 QT POS REC1 (0) não (2) sim

79 DATA I _____

80 DATA F _____

81 DROGAS _____

82 RXT POS RECIDIVA (0) não (2) sim

83 DATA I _____

84 DATA F _____

85 CAMPOS ____ (1) primário (2) meta (3) meta e primário

86 DOSES _____

87 Recidiva 2 (0) não teve (1) local (2) recidiva, local ign. (9) ignorado-perdido de vista assintomático < 5 anos

88 LOCAL (1) pulmão (2) osso (3) medula óssea (4) outras distâncias _____ (5) recidiva, local ign. (9) ignorado- perdido de vista assintomático < 5 anos (1) TUMOR PRIMÁRIO CENTRAL (PELVIS OU TÓRAX) : 40% (2) PROXIMAL AO TU PRIMÁRIO 30%, (4) DISTAL AO TU PRIMÁRIO : 15%

89 DATA _____

90 AP _____

91 CIRURGIA (0) não (1) sim

92 AP _____

93 DATA _____

94 IDADE _____

95 DX _____

96 Status margem: (0) livre (1) comprometida (3) EXÍGUA < 2 CM

97 TAMANHO Maior dimensão _____ dimensões adicionais _____

(0) não pode ser determinada

98 Paciente em acompanhamento sem tratamento (0) não (2) sim

99 RESPOSTA HISTOLÓGICA (NECROSE) (1) MÍNIMO (2) HUVOS I (3) HUVOS II (4) HUVOS IV (5) SEM NECROSE (6) AUSENTE (7) PRESENTE (9) NÃO DETERMINADO EXTENSÃO ESPECÍFICA ____%

100 TTO POS recidiva(0) não (1) sim

101 QT POS REC 2 (0) não (1) sim

102 DATA I _____

103 DATA F _____

104 DROGAS _____

105 RXT POS REC 2(0) não (2) sim

106 DATA I _____

107 DATA F _____

108 CAMPOS ____ (0) primário (1) meta (2) meta e primário

109 DOSES _____

110 META 1 (0) NAO (1) SIM

111 DATA _____

112 AP _____

113 CIRURGIA (0) não (1) sim

114 AP _____

115 DATA _____

116 IDADE _____

117 LOCAL _____ 1) extremidade inferior (fêmur, fibula, tibia, ou pé) 44% (2) Pélvis (ílio, sacro, púbis, ou ísquio) 24% (3) extremidade superior (úmero, escápula, rádio, ulna, ou mão) 17% (3) tórax (rib, vértebra, clavícula, mandíbula, ou crânio) 15% 4) MULTIPLAS

118 DX _____

119 Status margem: (0) livre (1) comprometida (3) EXÍGUA (<2CM)

120 TAMANHO(CM) Maior dimensão _____ dimensões adicionais _____

(0) não pode ser determinada

121 RESPOSTA HISTOLÓGICA (NECROSE) (1) MÍNIMO (2) HUVOS I (3) HUVOS II (4) HUVOS IV (5) SEM NECROSE (6) AUSENTE (7) PRESENTE (9) NÃO DETERMINADO EXTENSÃO ESPECÍFICA ____%

122 TTO POS META 1(0) não (1) sim

123 QT POS META 1(0) não (1) sim

124 DATA I _____

125 DATA F _____

126 DROGAS _____

127 RXT POS RECIDIVA 2 (0) não (2) sim

128 DATA I _____

129 DATA F _____

130 CAMPOS ____ (0) primário (1) meta (2) meta e primário

131 DOSES _____

132 METÁSTASE 2(0) não (2) sim

134 LOCAL (1) pulmão (2) osso (3) medula óssea (4) outras distâncias _____ (5) recidiva, local ign. (9) ignorado- perdido de vista assintomático < 5 anos (1) TUMOR PRIMÁRIO CENTRAL (PELVIS OU TÓRAX) : 40% (2)PROXIMAL AO TU PRIMÁRIO 30%, (4)DISTAL AO TU PRIMÁRIO : 15% 4) MULTIPLAS

135 DATA _____

136 CIRURGIA (0) não (1) sim

137 AP _____

138 DATA _____

139 IDADE _____

140 DX _____

141 Status margem: (0) livre (1) comprometida (3) EXÍGUA (<2CM)

142 TAMANHO Maior dimensão _____ dimensões adicionais _____

(0) não pode ser determinada

143 TTO (0) não (1) sim

144 QT PÓS META 2 (0) não (2) sim

145 DATA I _____

146 DATA F _____

147 DROGAS _____

148 RXT PÓS META 2 (0) não (1) sim

149 DATA I _____

150 DATA F _____

152 CAMPO _____

153 DOSES _____

154 METÁSTASE 3 (0) não (2) sim

155 LOCAL (1) pulmão (2) osso (3) medula óssea (4) outras distâncias _____ (5) recidiva, local ign. (9) ignorado- perdido de vista assintomático < 5 anos (1) TUMOR PRIMÁRIO CENTRAL (PELVIS OU TÓRAX) : 40% (2)PROXIMAL AO TU PRIMÁRIO 30%, (4)DISTAL AO TU PRIMÁRIO : 15%

156 DATA _____

157 CIRURGIA (0) não (1) sim

158 AP _____

159 DATA _____

160 IDADE _____

161 DX _____

162 Status margem: (0) livre (1) comprometida (3) EXÍGUA (<2CM)

163 TAMANHO Maior dimensão _____ dimensões adicionais _____

(0) não pode ser determinada

164 RESPOSTA HISTOLÓGICA (NECROSE) (1) MÍNIMO (2) HUVOS I (3) HUVOS II (4) HUVOS IV (5) SEM NECROSE (6) AUSENTE (7) PRESENTE (9) NÃO DETERMINADO EXTENSÃO ESPECÍFICA ____%

165 TTO (0) não (1) sim

166 QT PÓS META 2 (0) não (2) sim

167 DATA I _____

168 DATA F _____

169 DROGAS _____

170 RXT PÓS META 2 (0) não (1) sim

171 DATA I _____

172 DATA F _____

173 CAMPOS _____

174 DOSES _____

175 Paciente em acompanhamento sem tratamento (0) não (2) sim

176 2° TUMOR (0) não (2) sim

177 BX/CIRURGIA _____

178 DATA _____

179 IDADE _____

180 DX _____

181 RXT NA REGIÃO (0) não (2) sim - TU INDUZIDO

182 Paciente em acompanhamento sem tratamento (0) não (1) sim

183 HISTÓRIA FAMILIA(0) não (1) sim

184 PARENTESCO _____

185 DOENÇA _____

186 STATUS

187 Data da última informação objetiva de segmento: ___/___/___[][]

188. Status: (1) Vivo s/ doença (2) Vivo com doença (3) Morte pós-op (4) MOCA (5) Óbito p/ out/causas
_____ (6) Perdido de vista (definição: Para pacientes com menos de 5 anos de seguimento todos os que
deixaram de retornar por um período igual ao dobro estipulado. Pacientes assintomáticos perdidos após 5 anos devem
ser classificados como Vivos 000)

189 COMPLICAÇÕES (0) não (2) sim QUAIS? _____

190 ESTUDOS ADICIONAIS: _____

Especificar: (1) IHQ (2) FISH (3) RT-PCR [___/___/___]

191 COMENTÁRIOS

Coletador de Dados: **Ayala, F R. R. (2008)**

Anexo 5 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 14 de Setembro de 2007.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

Ref.: Projeto de Pesquisa nº 971/07
“Impacto prognóstico de aberrações cromossômicas em Tumor de Ewing/PNET”.

Prezado Doutor:

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 11/09/2007, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Declaração sobre o uso e destino do material biológico, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Termo de dispensa do consentimento livre e esclarecido;
- Termo de compromisso do pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Orçamento financeiro detalhado;
- Declaração de ciência e comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de comprometimento do Departamento de Biofísica e Genética Médica, Instituto do Câncer de Ontário, Faculdade de Medicina, Universidade de Toronto, Toronto, Canadá, sob a supervisão do Dr. Jeremy Squire.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 6 - Termo de Aprovação e Responsabilidade do Doutorado Sanduíche-PDEE/CAPES)



Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Ministério da Educação – Anexos I e II – 2º andar – Caixa Postal 365
70359-970 – Brasília, DF – Brasil

TERMO DE APROVAÇÃO E DE RESPONSABILIDADE – PDEE

Pelo presente termo (nome), **Fernando Augusto Soares** de nacionalidade brasileira, residente e domiciliado à **Rua Doutor Tomás Carvalho, 540**, na cidade **São Paulo**, portador do CPF **88570347804**, orientador da tese/dissertação de (nome aluno) **Fernanda Rocha Rojas Ayala** em programa de Doutorado na (IES brasileira) **Fundação Antônio Prudente**, aprova o plano e o cronograma de atividades a serem realizadas pelo orientando, na (Instituição Exterior) **Queen's University**, no período **01/04/2009 a 31/03/2010**, como parte dos estudos que desenvolve no Brasil, sobre o tema **Impacto Prognóstico de aberrações cromossômicas em tumor de Ewing/PNET**.

Assume o compromisso de manter a orientação e o acompanhamento do estudante, durante o período de realização do estágio no exterior, em conjunto com o co-orientador da instituição estrangeira, na condução das atividades propostas no plano e cronograma ora aprovados, envidando esforços para que o estudante apresente o empenho desejado, visando tornar proveitosas as atividades desenvolvidas no exterior, que serão avaliadas por meio de relatórios periódicos.

Caso o estudante obtenha bolsa pelo PDEE, o Orientador assume também a responsabilidade de realçar a relevância do atendimento pelo doutorando dos compromissos e obrigações assumidos quando da assinatura de termo próprio perante a CAPES, à época da implementação dos benefícios.

Local: São Paulo

Data: 01/10/08 Assinatura do Orientador:

Anexo 6 - Carta do orientador no exterior



Jeremy Squire, PhD
Department of Pathology and Molecular Medicine
Queen's University, Kingston General Hospital
Richardson Laboratory, 88 Stuart Street
Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6
Tel: 613-533-2345
Email: squirej@queensu.ca

Dr. Fernando Soares,
Hospital do Câncer AC Camargo,
Rua Professor Antonio Prudente 211,
Liberdade, CEP 01509-010
São Paulo, Brasil

January 12, 2009

Dear Fernando,
I am delighted that your student **Fernanda Ayala** has received a sandwich fellowship from CAPES to come to my laboratory at Queens in Canada from April 09 2009 until March 10, 2010 to work on our sarcoma collaboration.

As you know we have a long interest concerning the secondary chromosome aberrations observed in Ewing tumours in the context of disease outcome. I understand that you have ethics approval for this work, and there is sufficient good quality tumour samples and detailed follow up information to construct a statistically meaningful analysis of the effect of specific genomic imbalances on Ewing outcome.

Fernanda's main responsibilities will be to design and perform experiments concerning the molecular biology and cytogenetics of sarcomas under my overall direction here at Queens. She may spend part of her time working with my collaborator Dr Maria Zielenska at the University of Toronto as she also has a long-term interest in pediatric sarcoma cancer genetics and has developed some useful RT-PCR approaches to detection translocations in transcripts extracted from fixed tumours.

Day-to-day laboratory supervision at Queens will be provided by Dr Masa Yoshimoto. You and I will have monthly conference calls by SKYPE with Masa and Fernanda to make sure the project is on target. Fernanda's research will require her to: 1) isolate particular genomic fragments and preparation of these fragments for DNA and molecular cytogenetic analyses; 2) to perform computational and imaging-based data analyses as directed; 3) to participate in lab meetings with the technologists, postdocs and students under my supervision, where we discuss results, conclusions and freely exchange ideas associated with all current projects. 4) to provide, abstracts, reports and first drafts of manuscripts which will be submitted to international meetings and scientific journals.

I look forward to making Fernanda's visit to Canada successful and rewarding.

Sincerely,

Jeremy A. Squire PhD
Director, Translational Laboratory Research
NCIC Clinical Trials Group
Professor and Research Chair in Molecular Pathology
Department of Pathology and Molecular Medicine
Queen's University, Kingston, ON K7L 3N6 CANADA

Anexo 7 - Reação de Interfase *in situ* por Fluorescência (iFISH)

Para a reação de iFISH foram seguidas as etapas abaixo:

Primeiro dia:

- 1- Desparafinização em Xilol - 3 banhos de 10 minutos cada;
- 2- Passagens em álcool – 3 banhos de 5 minutos cada;
- 3- Banho em 2xSSC - 5 minutos em temperatura ambiente;
- 4- Pré-tratamento em Citrato pH 6,0 - em microondas de 2 em 2 minutos (5 vezes) com intervalos de 5 minutos a temperatura ambiente;
- 5- Digestão enzimática com pepsina (pronta pra uso) por 12 minutos em Banho Maria a 37C (tempo variável em decorrência do tipo de tecido);
- 6- Lavagem em solução de 2 X SSC pré-aquecida em banho – maria por 5 minutos;
- 7- Desidratação em álcool, 75%, 90%, 100% por 2 minutos cada;
- 8- Secagem das lâminas ao ar;
- 9- Aplicação da sonda desnaturada (75C por 5 min): 15 - 20µl da mistura das sondas ;
- 10- Aplicar a sonda ao abrigo da luz;
- 11- Cobrir os cortes lamínula e aplicar o selante em volta;
- 12- Colocar lâminas em suporte de vidro e colocar no microondas a temperatura inicial variando de 17C por 66 segundo (potência de 940W), a temperatura final recomendada é de 37C a 42C.
- 13- Incubação no Hibridador para co-desnaturação, e Hibridação (tempo e temperatura é variável dependendo da indicação do fornecedor da sonda);

Segundo dia:

- 1 Pré-aquecer solução de 2xSSC/0.3%IGEPAL NP-40 em banho-maria, à 76°C, até ficar com uma coloração opaca;
- 2 Mergulhar as lâminas em solução de 2xSSC/0.3%IGEPAL NP-40 – 76°C por 2 minutos;
- 3 Lavar em solução 2xSSC por 5 minutos à temperatura ambiente;
- 4 Desidratação em álcool 75%, 90% e 100% por 2 minutos cada;
- 5 Secagem das lâminas ao ar ;
- 6 Aplicar 15 - 20µl DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)
- 7 Montar com lamínula;
- 8 Deixar no freezer (-20C) por pelo menos 30 minutos.

Anexo 8 - Reação de Metáfase *in situ* por Fluorescência (MFISH)

Primeiro dia:

- 1) Selecionar as áreas de metáfase;
- 2) Desidratação em álcool, 75%, 90%, 100% por 2 minutos cada;
- 3) Secagem das lâminas ao ar;
- 4) Aplicação da sonda denaturada (75C por 5 min): 10µl da mistura das sondas ;
- 5) Aplicar a sonda ao abrigo da luz;
- 6) Cobrir os cortes lamínula e aplicar o selante em volta;
- 7) Incubação no Hibridador para co-desnaturação, e Hibridação (80C= 1 minuto; 37C = 18 horas);

Segundo dia:

- 1) Pré-aquecer solução de 2xSSC/0.3%IGEPAL NP-40 em banho-maria, à 76°C, até ficar com uma coloração opaca;
- 2)Mergulhar as lâminas em solução de 2xSSC/0.3%IGEPAL NP-40 – 76°C por 2 minutos;
- 3) Lavar em solução 2xSSC por 5 minutos à temperatura ambiente;
- 4) Desidratação em álcool 75%, 90% e 100% por 2 minutos cada;
- 5) Secagem das lâminas ao ar ;
- 6) Aplicar 15 - 20µl DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)
- 7) Montar com lamínula;
- 8) Deixar no freezer (-20C) por pelo menos 30 minutos.

Genomic copy number alterations at 1q32.1 and 16q21 stratify patients with high risk for relapse in Ewing Family of Tumors

Running head: Genomic alterations at 1q32.1 and 16q21 in Ewing's tumors

Fernanda R. R. Ayala^{1*}, Isabela W. da Cunha², Roberto Falzoni², Jeff Martin⁴, Maisa Yoshimoto³, Maria Zielenska⁴, Jeremy A. Squire³, Fernando A. Soares²

¹ International Research and Teaching Center, AC Camargo Hospital, Sao Paulo, Brazil; ² Department of Anatomic Pathology, AC Camargo Hospital, Sao Paulo, Brazil; ³ Department of Pathology and Molecular Medicine, Queens University, Kingston, ON, Canada; ⁴ Department of Paediatric Laboratory Medicine, Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada

Abstract:

Purpose

The *EWS-ETS* genetic fusion appears to be the initiating event in pathogenesis of the Ewing Family of Tumors (EFT). However, the progression of the disease due to additional genetic alterations is unclear. Thus, we analyzed the prognostic significance of specific genetic alterations in a cohort of EFT patients.

Patients and Methods

We performed *in silico* analysis using data from Progenetix databases to identify alterations at 1q and 16q, the most recurrent genetic alterations in EFT. Tissue microarrays (TMA) of 135 EFT patients were built for multi-color interphase fluorescent *in situ* hybridization (iFISH) analysis of aberrations at 1q32.1 and 16q21 using in-house probes. We correlated the frequencies of gene copy number alterations (CNA) with clinical parameters and follow-up information.

Results

CNA analysis showed gains at 1q32.1 in 15/128 (11.7%) cases, while abnormalities at 16q21 were seen in 24/118 (20.3%) patients. One group of patients, 11/118 (9.3%) showed only hemizygous deletion, whereas the other group, 13/118 (11%) showed gain at 16q21. A significant association between 1q gain and 16q loss was detected, but there was no significant synergism between these two events on clinical parameters. Univariate analyses showed gains at 16q21 ($p=0.029$) or 1q32.1 ($p=0.005$) associated with tumor relapse in those patients with localized disease. Disease-free

survival curves demonstrated regional gains as unfavorable outcome parameters for EFT patients. The multivariate model confirmed 1q32.1 (hazard ratio 2.8; $p < 0.02$) and 16q21 (hazard ratio 3.6; $p < 0.004$) gains as independent prognostic markers for relapse.

Conclusion

Genomic gains at 1q32.1 and 16q21 constitute valuable indicators of relapse in patients with localized EFT.

Keywords: Interphase FISH, Ewing's tumors, relapse, biomarkers.