

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR EM SARCOMAS  
PLEOMÓRFICOS INDIFERENCIADOS E  
LEIOMIOSSARCOMAS**

**SARA MARTORELI DA SILVEIRA**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra Silvia Regina Rogatto**

**São Paulo**

**2012**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silveira, Sara Martoreli da

**Diagnóstico molecular em sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas** / Sara Martoreli da Silveira – São Paulo, 2012.

144p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia.

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1. SARCOMA DE TECIDOS MOLES 2. SARCOMA. 3. HISTIOCITOMA FIBROSO MALIGNO. 4. LEIOMIOSSARCOMA 5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL 5. HIBRIDIZAÇÃO DE ÁCIDO NUCLEICO. 6. DIAGNÓSTICO.

## **ESTE TRABALHO É DEDICADO**

*Aos meus pais,  
João César e Vitória,  
e aos meus irmãos César e Karinna,  
por todo amor e apoio incondicionais,  
por serem minha lição de vida, minha fortaleza  
e o pilar em que sustento  
toda minha vida.*

*À Deus, pela bênção de viver.*

*“Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência: ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor, nada serei.”*

*(Trecho da Carta de São Paulo aos Coríntios)*

## AGRADECIMENTOS

### *À minha orientadora Dra. Silvia Regina Rogatto*

Os maiores e mais sinceros agradecimentos pela lição de vida nestes oito anos de convivência acadêmica. Sua confiança e orientação foram capazes de me guiar para um crescimento profissional e pessoal, demonstrando a importância da sinceridade, dedicação, obstinação e, acima de tudo, de manter o respeito por cada ser humano. Agradeço por cada ensinamento, por cada conselho e por cada minuto de conforto. Todo minha admiração e meu respeito pelo seu profissionalismo e capacidade excepcional de transformar o conhecimento em algo apaixonante. Muito obrigada por acreditar no meu sonho e permitir a concretização de uma vida!

### *Aos Professores e Colaboradores*

Dra Isabela Werneck da Cunha

Dr Ademar Lopes

Dr Cristovam Scapulatempo Neto

Pela colaboração imprescindível para realização deste trabalho.

*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências.*

*O homem que não tem os olhos abertos  
para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”*

*(Albert Einstein)*

***Aos colegas do Laboratório Neogene***

Agradeço por me auxiliarem em todos os momentos, sejam eles profissionais ou pessoais. Obrigada a estas pessoas que de maneiras diferentes foram importantes durante a minha caminhada ao longo destes oito anos de laboratório Neogene: Renata Canevari, Fernanda, Ariane, Cássia, Fabíola, Nádia, Priscila, Márcia, Miriam, Hellen, Mateus, Sandra, Juan, André, Rodrigo, Fabrício, Graziela, Rogério, Fábio, Ana, Luciana, Renata Bueno, Anderson e Deborah. Em especial, agradeço a toda dedicação de algumas pessoas da equipe que me auxiliaram no desenvolvimento deste projeto, incluindo Rolando Andre Rios Villacis, Fábio Albuquerque Marchi, Ariane Fidelis Busso e Mateus de Camargo Barros Filho.

***A amiga Renata de Azevedo Canevari***

Obrigada pela amizade e todo carinho durante estes longos anos de Botucatu até chegarmos em São Paulo. Você é uma amiga muito especial que eu guardo com carinho no coração!

***Aos novos amigos da Universidade Nove de Julho***

Agradeço por todo carinho e a imensa ajuda nesta nova jornada, especialmente as amigas Larissa Braylowisk, Giovana Alves e Larissa Sayuri Hirata.

*Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir.*

*Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende.*

*Amigo a gente sente!*

*(Machado de Assis)*

### ***A minha família***

Que representa o começo da minha vida e de um sonho que estamos construindo juntos, sempre segurando minhas mãos e guiando meus passos. Meus queridos pais, João Cesar e Vitória, eu os admiro profundamente pelo caráter, simplicidade, perseverança e amor incondicionais. Meus adorados irmãos, César e Karinna, pela amizade, respeito, cumplicidade, brigas, abraços, palavras de conforto e carinho, apoio e incentivo em cada momento da minha vida e, principalmente, por fazer com que nossa convivência seja eternamente lúdica. Minha família representa o pilar em que sustento toda minha vida e são um presente divino em minha existência!

### ***Ao meu namorado Rodrigo***

Agradeço por compartilhar este sonho nestes dois anos de convivência. É impossível deixar de agradecê-lo pelo carinho, companheirismo, cumplicidade e amor em todos os momentos. Você é uma pessoa maravilhosa e seu sorriso é um presente valioso. Obrigada, Amore!

*“É preciso amor para poder pulsar, é preciso paz para poder sorrir...”*

*(Tocando em frente, Almir Sater)*

*Aos funcionários do Programa de Pós-graduação e da Biblioteca da Fundação Antônio Prudente - Hospital A. C. Camargo*

Pela recepção sempre atenciosa com os alunos.

*Aos alunos e funcionários do CIPE-Centro Internacional de Ensino e Pesquisa*

Que sempre foram receptivos e auxiliaram em diversos momentos do trabalho.

*À Fundação Antônio Prudente e ao Hospital A. C. Camargo*

Pela estrutura, ensino e formação de excelência.

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*

Pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”*

*Albert Einstein*

*Aos pacientes*

Que cederam um pedacinho da sua história para idealização deste trabalho e, primordialmente, confiaram em cada promessa de esperança. Minha sincera gratidão a esses heróis que munidos pela crença em vencer cada dia, ensinam-nos a lutar pela vida e nos impulsionam a buscar novos caminhos na ciência e na vida.

*“A vida me ensinou  
A abrir minhas janelas para o amor;  
A não temer o futuro;  
Me ensinou e está me ensinando a aproveitar o presente,  
como um presente que da vida recebi, e usá-lo como um diamante que eu mesmo  
tenha que lapidar, lhe dando forma da maneira que eu escolher.”  
(Charles Chaplin)*

A todos que contribuíram direta  
ou indiretamente para execução  
e conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

## RESUMO

Silveira SM. **Diagnóstico molecular em sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O sarcoma pleomórfico indiferenciado (SPI) é uma lesão de alto grau que, em geral, exibe um comportamento clinicamente agressivo com o desenvolvimento frequente de metástases à distância e recidiva local. Estes tumores são caracterizados por alterações genômicas complexas e considerável heterogeneidade biológica intratumoral. A classificação dos SPI é uma questão controversa pelo fato destes tumores compartilharem um padrão morfológico similar com outros subtipos indiferenciados e pleomórficos de outras entidades definidas de sarcomas, particularmente leiomiossarcomas (LMS). O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de alterações no número de cópias genômicas em SPI e LMS e correlacionar os resultados com os dados clínicos e histopatológicos. Foram avaliados 20 SPI e 17 LMS por CGH-array (*Agilent Human 4x44K CGH Microarrays*). Os dados foram extraídos usando o software *Feature Extraction 10.1.1.1* e análise dos resultados foi realizada no programa *Nexus 6.0* (Biodiscovery) com algoritmo estatístico *FASST segmentation 2* e limiar de significância de  $1,00E-5$ . Foram identificadas 31 alterações genômicas significativas associadas com características de pior prognóstico. Entre os SPI, os ganhos em 16q24.3 e perdas em 18p11.32 foram significativamente associados a pacientes sem sinais da doença ( $P = 0,043$ ) e com a doença ( $P = 0,016$ ), respectivamente. Entre os LMS, ganhos em 1q21.3, 11q12.2-q12.3 e 19q13.12 foram significativamente associados a pacientes que morreram pela doença ( $P = 0,001$ ,  $P = 0,003$  e  $P = 0,020$ , respectivamente). Ganhos em 1q21.3 foram também correlacionados com desenvolvimento de metástases a distância ( $P = 0,001$ ). Em adição, os ganhos em 17q25.1 e 19q13.43, assim como as perdas em 16p11.2 foram associados significativamente com recorrência local em LMS ( $P = 0,041$ ,  $P = 0,044$  e  $P = 0,006$ , respectivamente). A análise da sobrevida global em SPI revelou que as perdas em 1q21.1-q21.2 foram significativamente associados com

redução da sobrevida global dos pacientes ( $P = 0,0019$ ). Nos casos de LMS, ganhos em 1q21.3, 6p21.32, 11q12.2-q12.3, 16p11.2, 19q13.12 e 19q13.43 foram associados significativamente com a redução da sobrevida ( $P < 0,05$ ). Embora, alterações cromossômicas específicas tenham sido detectadas em SPI e LMS, não foi possível distingui-los pela análise de agrupamento hierárquico não supervisionado. Três grupos distintos foram formados, dos quais o *cluster 2* foi caracterizado por casos de pacientes que morreram em decorrência da doença ( $P = 0,022$ ). Foram selecionados quatro genes (*ARNT*, *PBXIP1*, *SLC27A3* e *CCND1*) mapeados nas regiões alteradas pela CGH-array, dos quais três estão mapeados em 1q21. Os ganhos envolvendo os genes *ARNT*, *PXIP1* e *SCL27A3* confirmaram as alterações detectadas previamente pela CGH-array em SPI e LMS, particularmente envolvendo o gene *ARNT* que foi alterado preferencialmente em SPI. Os dados deste estudo demonstram uma interação complexa entre SPI e LMS, não permitindo a distinção entre os dois tipos tumorais. Em adição, foram relatadas alterações genômicas específicas associadas com características prognósticas e sobrevida global, que podem contribuir para o delineamento de estratégias terapêuticas mais precisas.

## SUMMARY

Silveira SM. [**Molecular diagnosis in undifferentiated pleomorphic sarcomas and leiomyosarcomas**]. São Paulo, 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Undifferentiated high-grade pleomorphic sarcoma (UPS), previously known as malignant fibrous histiocytomas (MFHs), is considered as high-grade lesion that display an aggressive clinical behavior with frequent development of distant metastases and local recurrence. These tumors are generally characterized by complex genomic alterations as well as intratumoral heterogeneity. The classification of UPS is a controversial issue because these tumors share a similar morphological pattern with undifferentiated and pleomorphic subtypes of other entities, particularly leiomyosarcoma (LMS). The aim of this study was to evaluate the genome profile of 20 UPS and 17 leiomyosarcomas (LMS) by array-based comparative genomic hybridization (array CGH) and correlated the findings with the clinical course and histopathological data. Array CGH was performed using the Human 44K Agilent oligoarrays according to manufacturer's instructions. Data were extracted using the Feature Extraction software, version 10.1.1.1.1, and analyzed by Nexus Software v 6.0 (BioDiscovery), with a FASST2 (Fast Adaptive States Segmentation Technique 2) algorithm. Thirty-three significant DNA copy number alterations were identified in UPS and LMS and they were associated with clinical data. Gains at 16q24.3 and loss at 18p11.32 were significantly detected in patients that are alive without the disease ( $P = 0.043$ ) and alive with the disease ( $P = 0.016$ ), respectively. In LMS, gains at 1q21.3, 11q12.2-q12.3 and 19q13.12 were significantly associated with patients that dead by the disease ( $P = 0.001$ ,  $P = 0.003$  and  $P = 0.020$ , respectively). Gains at 1q21.3 were also associated with metastasis development ( $P = 0.001$ ). In addition, gains at 17q25.1 and 19q13.43, as well as losses at 16p11.2 were significantly associated with local recurrence ( $P = 0.041$ ,  $P = 0.044$  e  $P = 0.006$ , respectively). Overall survival analyses showed that loss at 1q21.1-q21.2 was significantly associated with reduced patient survival in UPS ( $P = 0.0019$ ). In LMS,

gains involving 1q21.3, 6p21.32, 11q12.2-q12.3, 16p11.2, 19q13.12 and 19q13.43 were associated with decreased overall survival ( $P < 0.05$ ). Although, copy number profile of UPS and LMS was indistinguishable by unsupervised hierarchical clustering analysis, one cluster presented significant association with poor prognosis ( $P = 0.022$ ). Four genes (*ARNT*, *PBXIP1*, *SLC27A3* and *CCND1*) were selected in the regions altered by array CGH, three of which are mapped on 1q21. In addition, relative copy number of *ARNT*, *SLC27A3*, *PBXIP1* and *CCND1* was evaluating by qPCR to confirm the alterations found by array CGH. Gains exclusively involving gene *ARNT* were detected in UPS. In overall, the findings showed a complex interaction between UPS and LMS, while genomic profiles of the two tumors were indistinguishable. Furthermore, we report genomic alterations associated with prognosis and overall survival, which may contribute to better stratify these patients for treatment.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Aspecto morfológico de sarcomas pleomórficos e leiomiiossarcomas. Coloração com hematoxilina e eosina (HE), objetiva de 40x.....	43
<b>Figura 2</b>	Representação gráfica do número de alterações em todo o genoma e por cromossomo encontrados nos 20 casos de SPI avaliados pela metodologia de CGH- <i>array</i> .....	47
<b>Figura 3</b>	Dados de dispersão baseados no tamanho das alterações genômicas (ganhos e perdas) encontradas para os 20 casos de SPI avaliados pela metodologia de CGH- <i>array</i> .....	47
<b>Figura 4</b>	Ideograma ilustrando as alterações genômicas encontradas nos 20 casos de SPI avaliados pela técnica de CGH- <i>array</i> .....	48
<b>Figura 5</b>	Ideograma ilustrando a distribuição das alterações genômicas encontradas nos 20 casos de SPI avaliados pela técnica de CGH- <i>array</i> em todo o conjunto cromossômico (chr1-chr22).....	49
<b>Figura 6</b>	(A) Representação gráfica do padrão de hibridação de uma amostra de SPI na plataforma de 4x 44 K, onde são representadas o padrão de distribuição das sondas em todo conjunto cromossômico (coloração específicas para as sondas em cada cromossomo). (B) Representação esquemática das 16 alterações genômicas que foram significativamente frequentes em mais que 20% dos SPI avaliados (cromossomos 1, 2, 3, 7, 8, 9, 11, 16, 18 e 20).....	52
<b>Figura 7</b>	Representação gráfica do número de alterações em todo o genoma e por cromossomo encontrados nos 17 casos de LMS avaliados pela metodologia de CGH- <i>array</i> .....	56

<b>Figura 8</b>	Dados de dispersão baseados no tamanho das alterações genômicas (ganhos e perdas) encontradas para os 17 casos de LMS avaliados pela metodologia de CGH- <i>array</i> .....	56
<b>Figura 9</b>	Ideograma ilustrando as alterações genômicas encontradas nos 17 casos de LMS avaliados pela técnica de CGH- <i>array</i> .....	57
<b>Figura 10</b>	Ideograma ilustrando a distribuição das alterações genômicas encontradas nos 17 casos de LMS avaliados pela técnica de CGH- <i>array</i> em todo o conjunto cromossômico (chr1-chr22).....	58
<b>Figura 11</b>	(A) Representação gráfica do padrão de hibridação de uma amostra de LMS na plataforma de 4x 44 K, onde são representadas o padrão de distribuição das sondas em todo conjunto cromossômico (coloração específicas para as sondas em cada cromossomo). (B) Representação esquemática das 15 alterações genômicas que foram significativamente frequentes em mais que 20% dos LMS avaliados (cromossomos 1, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 16, 17 e 19).....	61
<b>Figura 12</b>	Representação gráfica do número total de alterações genômicas encontradas nas 20 amostras de sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI) e nas 17 amostras de leiomiiossarcomas (LMS) avaliadas pela metodologia de CGH- <i>array</i> .....	66
<b>Figura 13</b>	Comparação do padrão geral de alterações em todo o conjunto cromossômico (ch1 - ch22) para os 37 casos de sarcomas.....	67
<b>Figura 14</b>	Comparação do perfil genômico de acordo com as características clínicas como metástase à distância (A), recorrência local (B) e óbito pela doença-OPD (C) para todo o conjunto cromossômico.....	73

<b>Figura 15</b>	Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado realizada nas 37 amostras de sarcomas (20 sarcomas pleomórficos indiferenciados e 17 leiomiossarcomas) baseada no perfil de alterações genômicas encontrado em cada caso.....	77
<b>Figura 16</b>	Representação gráfica da comparação do padrão de alterações genômicas para <i>cluster 1</i> (11 casos), <i>cluster 2</i> (16 casos) e <i>cluster 3</i> (10 casos).....	78
<b>Figura 17</b>	Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> segundo alterações genômicas nos casos sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI) e para cada <i>cluster</i> avaliados por CGH-array.....	81
<b>Figura 18</b>	Curvas de <i>Kaplan-Meier</i> segundo alterações genômicas nos casos leiomiossarcomas (LMS) avaliados por CGH-array.....	82
<b>Figura 19</b>	Ideogramas demonstrando a localização dos quatro genes ( <i>ARNT</i> , <i>PBXIP1</i> , <i>SLC27A3</i> e <i>CCND1</i> ) selecionados para a avaliação das alterações no número de cópias em 11 LMS e 16 SP usando a PCR quantitativa em tempo real.....	87
<b>Figura 20</b>	Representação da curva-padrão (esquerda) e curva de dissociação (direita) obtidas para os oito iniciadores presentes em cada um dos quatro genes avaliados por qPCR: <i>ARNT_P1</i> (A), <i>ARNT_P2</i> (B), <i>ARNT_P3</i> (C), <i>PBXIP1_P1</i> (D), <i>PBXIP1_P2</i> (E), <i>SLC27A3_P1</i> (F), <i>CCND1_P1</i> (G) e <i>CCND1_P2</i> (H).....	88
<b>Figura 21</b>	Representação gráfica da avaliação do número de cópias genômicas nas amostras de sarcoma pleomórfico indiferenciado (16) e leiomiossarcoma (11) pela metodologia de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Genes selecionados para as ampliações pela qPCR e os iniciadores.....	35
<b>Tabela 2</b>	Dados clínicos e patológicos dos pacientes incluídos no estudo: 20 sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI) e 17 leiomiossarcomas (LMS).....	39
<b>Tabela 3</b>	Resultados da análise imunoistoquímica utilizando marcadores proteicos relacionados com a função muscular.....	42
<b>Tabela 4</b>	Regiões genômicas alteradas recorrentes entre os 20 casos de sarcomas pleomórficos indiferenciados ( $P < 0,05$ ).....	53
<b>Tabela 5</b>	Regiões genômicas alteradas recorrentes entre os 17 casos de leiomiossarcomas ( $P < 0,05$ ).....	62
<b>Tabela 6</b>	Alterações genômicas exclusivas presentes em mais de 30% dos casos nos SPI ( $P < 0,05$ ) obtidas pela análise comparativa dos dois grupos.....	68

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Estratificação dos sarcomas segundo características histopatológicas e moleculares.....	7
<b>Quadro 2</b>	Relatos publicados em Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados e Leiomiossarcomas usando as metodologias de CGH cromossômico e CGH-array.....	17
<b>Quadro 3</b>	Marcadores moleculares que afetam o prognóstico de pacientes em SPI e LMS.....	22
<b>Quadro 4</b>	Alterações genômicas presentes em pacientes que desenvolveram metástase à distância ou recorrência local.....	74
<b>Quadro 5</b>	Alterações envolvidas em ganhos exclusivas para o <i>cluster 2</i> observadas previamente em SPI e LMS.....	79

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

### Lista de siglas em inglês

<b>AIDS</b>	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
<b>BAC</b>	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>cDNA</b>	<i>Complementary DNA</i>
<b>CGH</b>	<i>Comparative genomic hybridization</i>
<b>CGH-array</b>	<i>Array comparative genomic hybridization</i>
<b>CNA</b>	<i>Copy Number Alteration</i>
<b>CNV</b>	<i>Copy Number Variation</i>
<b>Cq</b>	<i>Cycle Quantitative</i>
<b>Cy</b>	<i>Cyanine</i>
<b>DGV</b>	<i>Database of Genomic Variants</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<b>dNTP</b>	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
<b>FASST2</b>	<i>Fast Adaptive States Segmentation Technique 2</i>
<b>FISH</b>	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
<b>FNCLCC*</b>	<i>Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer</i>
<b>HSR</b>	<i>Chromosomal homogeneously staining regions</i>
<b>Log</b>	<i>Logaritmo</i>
<b>LOH</b>	<i>Loss of Heterozigosity</i>
<b>miRNA</b>	<i>microRNA</i>
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i>
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NURD</b>	<i>Nucleosome remodeling and histone deacetylation</i>
<b>NCCN</b>	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
<b>NCI</b>	<i>National Cancer Institute</i>
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frame</i>
<b>OVS</b>	<i>Overall Survival</i>
<b>PCR-SSCP</b>	<i>Polymerase chain reaction–single-strand conformation polymorphism</i>

<b>qPCR</b>	<i>Quantitative -Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i>
<b>TMA</b>	<i>Tissue Microarrays</i>
<b>UTR</b>	<i>Untranslated Region</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

\* Em francês.

## **Lista de siglas em português**

<b>SPM</b>	Sarcomas de partes moles
<b>FHM</b>	Fibrohistiocitoma Maligno
<b>GIST</b>	Tumor estromal gastrointestinal
<b>HE</b>	Coloração Hematoxilina e Eosina
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LMS</b>	Leiomiossarcoma
<b>LP</b>	Lipossarcoma
<b>SO</b>	Sarcomas ósseos
<b>SPI</b>	Sarcoma pleomórfico indiferenciado de Alto Grau de Malignidade
<b>SS</b>	Sarcoma sinovial

**Observação:** A nomenclatura dos genes observados no presente trabalho está disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Sarcomas de partes moles (SPM) .....	1
1.2	Sarcomas pleomórficos indiferenciados de alto grau de malignidade (SPI) .....	10
1.3	Leiomiossarcomas (LMS).....	13
1.4	Alterações genômicas e moleculares em sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas.....	15
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivos específicos .....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1	Caracterização da amostra .....	28
4.2	Extração de DNA .....	29
4.3	CGH-array ( <i>array-based comparative genomic hybridization</i> ).....	29
4.3.1	Marcação das amostras .....	29
4.3.2	Hibridação e lavagem.....	31
4.3.3	Extração e análise dos dados de CGH-array .....	31
4.4	PCR quantitativa em tempo real (qPCR) .....	33
4.5	Análises estatísticas.....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
5.1	Características clínicas e patológicas.....	38
5.2	Análise do número de cópias genômicas em sarcomas pleomórficos e leiomiossarcomas .....	44
5.2.1	Sarcomas pleomórficos indiferenciados .....	44
5.2.2	Leiomiossarcomas.....	55

5.3	Comparação entre as alterações genômicas presentes nos sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas .....	64
5.4	Análise das alterações genômicas e características clínicas de pior prognóstico.....	72
5.5	Análise de agrupamentos baseada no padrão de alterações genômicas.....	75
5.6	Análise da sobrevida global e relação com padrões genômicos nas amostras de sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas.....	80
5.7	Avaliação do número de cópias do DNA pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR) .....	85
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>124</b>

## ANEXOS

- Anexo 1** Regiões genômicas envolvidas em alto nível de ganhos (amplificações) nos Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados avaliados por CGH-*array*.
- Anexo 2** Regiões genômicas envolvidas em deleções homozigotas nos Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados avaliados por CGH-*array*.
- Anexo 3** Regiões genômicas envolvidas em alto nível de ganhos (amplificações) nos Leiomiossarcomas avaliados por CGH-*array*.
- Anexo 4** Regiões genômicas envolvidas em deleções homozigotas nos Leiomiossarcomas avaliados por CGH-*array*.
- Anexo 5** Análise comparativa das alterações genômicas presentes em mais de 30% dos casos nos SPI e LMS ( $P < 0,05$ ).
- Anexo 6** Alterações genômicas observadas exclusivamente nos pacientes que desenvolveram metástases à distância ( $P < 0,05$ ).

- Anexo 7** Alterações genômicas observadas exclusivamente nos pacientes que apresentaram recorrência local ( $P < 0,05$ ).
- Anexo 8** Alterações genômicas observadas exclusivamente nos pacientes que foram a óbito pela doença (câncer) ( $P < 0,05$ ).
- Anexo 9** Análise comparativa das alterações genômicas detectadas entre os *cluster 1* versus *clusters 2* ( $P < 0,05$ ).
- Anexo 10** Análise comparativa das alterações genômicas detectadas entre os *cluster 2* versus *clusters 3* ( $P < 0,05$ ).
- Anexo 11** Análise comparativa das alterações genômicas detectadas entre os *cluster 1* versus *clusters 3* ( $P < 0,05$ ).
- Anexo 12** Resultados da análise do número de cópias do DNA nas amostras de SPI (16) e LMS (11) avaliados pela metodologia de qPCR.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 SARCOMAS DE PARTES MOLES (SPM)

As neoplasias de origem mesenquimal são capazes de se diferenciar a partir de diversos tipos celulares, tais como tecido conectivo, ósseo, cartilaginoso e os sistemas sanguíneo e linfático (DUCIMETIERE et al. 2011). Estas neoplasias são classificadas histologicamente de acordo com o tecido maduro com que se assemelham e podem ser benignas e malignas (BECK et al. 2010; GUILLOU e AURIAS 2010). O primeiro grupo representa a maioria dos tumores mesenquimais e apresenta uma taxa de cura muito elevada após cirurgia. Os tumores presentes no segundo grupo, caracterizados por sarcomas, são relativamente raros e potencialmente fatais, representando um desafio diagnóstico e terapêutico, uma vez que apresentam um padrão de crescimento invasivo e destrutivo, recidiva local e metástases (FLETCHER et al. 2002; NAKAYAMA et al. 2007).

Os sarcomas constituem um grupo heterogêneo significativo de neoplasias mesenquimais malignas classificadas em sarcomas de partes moles (SPM) e sarcomas ósseos (SO). Em 2002, a classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO) descreveu mais de 50 subtipos histológicos de SPM e SO que apresentam distintas características clínicas, biológicas, histopatológicas e citogenéticas (FLETCHER et al. 2002; BLAY e LE CESNE 2009; THWAY 2009). Em conjunto, estes tumores representam aproximadamente 1% das neoplasias em pacientes adultos e 15% dos tumores na infância, sendo mais frequentes na idade adulta (OSUNA e

DE ALAVA 2009; JEMAL et al. 2010; DEMETRI et al. 2010). Nos Estados Unidos, estima-se a ocorrência de aproximadamente 10.500 novos casos de SPM a cada ano, enquanto sarcomas ósseos contribuem anualmente com aproximadamente 2.600 casos (STEEN e STEPHENSON 2008; DEMETRI et al. 2010; DEMICCO e LAZAR 2011). Não existem dados sobre a incidência de sarcomas no Brasil.

Os SPM representam aproximadamente 75% de todos os sarcomas e os tipos mais comuns incluem o sarcoma pleomórfico indiferenciado (SPI), tumor estromal gastrointestinal (GIST), lipossarcoma (LP), leiomiossarcoma (LMS) e sarcoma sinovial (SS) (COINDRE et al. 2001). Os sítios anatômicos comumente acometidos por SPM primários são as extremidades (46% nas coxas, nádegas ou virilha; 13% nas extremidades superiores), tronco (19%), retroperitônio (15%), e cabeça e pescoço (7%) (JEMAL et al. 2010). Entre os tumores de extremidades e tronco, cerca de um terço são superficiais, com um diâmetro médio de 5 cm, enquanto dois terços são profundos, com um diâmetro médio de 9 cm. O aumento do tumor está associado com menor intervalo livre de metástases que diminui significativamente a sobrevida dos pacientes. Há uma ligeira predominância do sexo masculino e a incidência pode variar de acordo com a faixa etária: o rabdomiossarcoma embrionário ocorre quase exclusivamente em crianças, o sarcoma sinovial é mais frequente em jovens adultos, enquanto o sarcoma pleomórfico de alto grau, lipossarcoma e leiomiossarcomas são mais comuns com o aumento da idade (idade média de 65 anos) (FLETCHER et al. 2002).

Os SPM exibem um amplo espectro de comportamento biológico, abrangendo desde tumores localmente invasivos até altamente agressivos que progridem rapidamente para metástases, sendo letais na maioria dos casos. Um

décimo dos pacientes com SPM apresenta metástases detectáveis (mais comum em pulmões) ao diagnóstico do tumor primário. Em geral, um terço dos pacientes com SPM morre em decorrência da doença, sendo a maioria por metástase pulmonar (FLETCHER et al. 2002; LEHNHARDT et al. 2009). Pacientes com SPM apresentam uma sobrevida estimada de cinco anos em aproximadamente 50% dos casos (CLARK et al. 2005).

O estadiamento tumoral e a graduação histológica são importantes parâmetros para o diagnóstico dos sarcomas, assim como, para predizer o curso clínico e o planejamento de terapia. O grau histológico avalia o grau de malignidade e a probabilidade de desenvolvimento de metástases à distância, sendo que os parâmetros histológicos mais importantes são a avaliação do grau de diferenciação (de acordo com o tipo ou subtipo histológico), o índice mitótico e a extensão da necrose tumoral (VAN UNNIK et al. 1993; COINDRE et al. 2001; FLETCHER et al. 2002; CANTER et al. 2010). Alguns estudos demonstraram que pacientes com tumores de alto grau apresentam uma melhor resposta inicial a quimioterapia em relação aos pacientes com tumores de baixo grau histológico (COINDRE et al. 1996; EDGE et al. 2010). No entanto, a graduação histológica em SPM apresenta um valor limitado em predizer recorrência local em pacientes com doença localizada, o que está principalmente relacionado com o comprometimento das margens cirúrgicas (CLARK et al. 2005; LAHAT et al. 2009). O sistema de estadiamento dos SPM se baseia na *National Cancer Institute* (NCI) e *Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer* (FNCLCC) (COSTA et al. 1984; GUILLOU et al. 1997). O sistema NCI considera uma combinação de parâmetros, como tipo histológico, celularidade, pleomorfismo e taxa mitótica (COSTA et al. 1984). O sistema

FNCLCC é baseado em uma pontuação avaliando três parâmetros, incluindo diferenciação tumoral, taxa mitótica e área de necrose (GUILLOU et al. 1997).

A principal modalidade terapêutica em SPM é a cirurgia que pode ser associada à quimioterapia e/ou radioterapia, particularmente nos casos onde a perda severa da função do membro é provável em decorrência da cirurgia (FLETCHER et al. 2002; GANJOO e JACOBS 2010; NIELSEN e WEST 2010). A radioterapia é utilizada no controle local, reduzindo a incidência de recorrência local, contudo não influencia o controle de micrometástases em SPM. A quimioterapia é utilizada no controle local e sistêmico dos SPM, incluindo tratamento paliativo em tumores avançados, redução do tamanho para facilitar a ressecção do tumor primário, metástases pulmonares (ou em outros sítios) e como tratamento adjuvante ou neoadjuvante em tumores de alto grau (AGUIAR JUNIOR et al. 2009; ERIKSSON 2010). Esquemas quimioterápicos, particularmente a combinação de doxorrubicina e a ifosfamida, são amplamente utilizados no tratamento de SPM com melhores taxas de resposta global (completa ou parcial) em casos de doença metastática (20% a 30%). No entanto, o tratamento quimioterápico traz benefícios limitados e geralmente não melhora o tempo de progressão tumoral ou a sobrevida dos pacientes (GANJOO e JACOBS 2010; ERIKSSON 2010; VERWEIJ e BAKER 2010). Estudo realizado em no Hospital do Câncer A. C. Camargo, SP, demonstrou uma associação entre a terapia com quimiorradiação neoadjuvante e a melhora na taxa de controle local da doença em pacientes com SPM de extremidades (AGUIAR JUNIOR et al. 2009). Semelhante a outros estudos (FLETCHER et al. 2002; GANJOO e JACOBS 2010; NIELSEN e WEST 2010; BECK et al. 2010; ERIKSSON 2010), este também

não detectou mudanças na taxa de metástase à distância e na sobrevida global dos pacientes.

Diversas síndromes genéticas também estão associadas com o desenvolvimento de sarcomas. A Neurofibromatose do tipo 1 (*NF1*) ou doença von Recklinghausen está relacionada com alto risco de desenvolvimento de tumor maligno da bainha perineural. A Neurofibromatose do tipo 2 está associada com o desenvolvimento de meningiomas e schwannomas. O desenvolvimento de sarcomas de partes moles é também relatado em pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni (*TP53*) e do Retinoblastoma (*RBI*) (SKUBITZ e D'ADAMO 2007).

Nas últimas décadas o conhecimento adquirido por métodos citogenéticos e moleculares permitiu o avanço no conhecimento dos mecanismos biológicos dos sarcomas, incluindo a diversidade de anormalidades cromossômicas e genômicas revelando marcadores com potencial para serem utilizados na classificação e distinção dos diferentes subtipos tumorais.

Análises de expressão gênica e outras técnicas em larga escala demonstraram ser efetivas na identificação das vias biológicas essenciais em sarcomas específicos, gerando resultados que podem ser traduzidos em marcadores moleculares úteis ao diagnóstico. Em adição, a disponibilidade dos bancos de dados públicos e das novas tecnologias de sequenciamento pode acelerar este processo promovendo a identificação de vias oncogênicas de particular importância para o delineamento de alvos terapêuticos (OSUNA e DE ALAVA 2010).

Sob o aspecto molecular, os sarcomas podem ser classificados de acordo com a presença ou ausência de mutações específicas, ou seja, aqueles tumores com alterações genéticas únicas, como translocações recíprocas, mutações somáticas,

deleções intragênicas ou ampliações específicas, e aqueles com alterações genéticas múltiplas e cariótipos complexos (WARDELMANN et al. 2010). A partir destes dois grupos, NIELSEN e WEST (2010) estratificaram os sarcomas em quatro subgrupos de acordo com o padrão histológico, características clínicas, e eventos moleculares específicos: (1) No grupo 1 estão incluídos os sarcomas bem diferenciados (histologia não pleomórfica) que exibem alterações genéticas não complexas e recorrentes, tais como translocações cromossômicas (resultando na fusão de genes) ou mutações em ponto; (2) O grupo 2 inclui sarcomas que afetam pacientes jovens e geralmente exibem histologia não-pleomórfica associada a eventos citogenéticos com limitada complexidade, embora nenhum marcador específico tenha sido identificado; (3) O grupo 3 refere-se a sarcomas que afetam pacientes adultos e com histologia pleomórfica associada a eventos moleculares tumor-específicos em alguns casos, embora apresentem elevada complexidade cariotípica; (4) O grupo 4 é constituído por sarcomas que são frequentemente observados em pacientes adultos, são caracterizados por uma histologia pleomórfica e apresentam perfil de expressão e cariótipos complexos. Os aspectos histológicos e moleculares para estratificação dos quatro grupos de sarcomas foram compilados no Quadro 1.

**Quadro 1** - Estratificação dos sarcomas segundo características histopatológicas e moleculares.

Grupos Tumorais	Padrão histológico	Classificação	Alteração citogenética	Alteração gênica
<b>Grupo 1</b>	Não pleomórficos (bem diferenciados)	SS	t(X;18)(p11;q11)	Fusão <i>SS18-SSX1</i>
		RMA	t(2,13)(q35;q14), (1;13)(p36;q14) ou <i>double minutes</i>	Fusões <i>PAX3-FKHR</i> ou <i>PAX7-FKHR</i>
		LPM	t(12;16)(q13;p11) ou t(12;22)(q13;q12)	Fusões <i>TLS-CHOP</i> ou <i>EWS-CHOP</i>
		SEW	t(11;22)(q24;q12) ou t(21;22)(q12;q12)	Fusões <i>EWS-FLI1</i> ou <i>EWS-ERG</i>
		GIST	-	Mutação <i>KIT</i> ou <i>PDGFRA</i>
		DFBP	t(17;22)(q21;q13)	Fusão <i>COL1A1-PDGFB</i>
<b>Grupo 2</b>	Não pleomórficos	AD	NI	NI
		CD		
		SE		
<b>Grupo 3</b>	Pleomórficos	LPD	-	Amplificações em <i>CDK4/MDM2</i>
		TMBNP	-	Deleções em <i>NF1</i>
		SFM	t(1;10)	Amplificação em 3p
<b>Grupo 4</b>	Pleomórficos	SPI	Cariótipo Complexo	Inúmeras alterações
		LMS		
		RMP		
		LPP		
		AN		
		OS		
		FBSM		
SM				

**Legenda:** AD: Adamantinoma; AN: Angiossarcomas; CD: Cordoma; DFBP: Dermatofibrossarcoma protuberans; FBSM: Fibrossarcoma mixóide; GIST: Tumores gastrointestinais; LMS: Leiomiossarcoma; LPD: Lipossarcoma indiferenciado; LPM: Lipossarcoma mixóide; LPP: Lipossarcoma pleomórfico; OS: Osteossarcoma; NI: Não identificado; RMA: Rbdomiossarcoma alveolar; RMP: Rbdomiossarcoma pleomórfico; SE: Sarcoma epitelióide; SEW: Sarcoma de Ewing; SFM: Sarcoma fibroblástico mixoinflamatório; SM: Sarcoma miofibroblástico; SPI: Sarcoma pleomórfico indiferenciado de alto grau/FHM; SS: Sarcoma sinovial; TMBNP: Tumores malignos de bainha de nervo periférico.

Para os sarcomas caracterizados no primeiro grupo, são utilizados alguns marcadores que auxiliam na classificação e no diagnóstico como observado no Quadro 1 (BORDEN et al. 2003; SKUBITZ e D'ADAMO 2007; SKUBITZ et al. 2008). Em adição, alvos terapêuticos baseados nos achados moleculares destes tumores já foram inseridos na prática clínica, incluindo produtos gênicos quiméricos resultantes de translocações cromossômicas (como fatores de transcrição anômalos) e da ativação de determinados genes em vias de sinalização específicas (como AKT/PI3K/mTOR) (BENJAMIN et al. 2009; LEMM et al. 2009). O desenvolvimento de Imatinib para GIST representa um exemplo de desenvolvimento de tratamentos baseado em alterações moleculares câncer-específicas (VERWEIJ et al. 2004; DEMETRI et al. 2010). Estes resultados sugerem que os ensaios clínicos futuros para os sarcomas precisam ser projetados considerando-se os subtipos moleculares específicos como doenças distintas (NIELSEN e WEST 2010).

Nos tumores pertencentes ao quarto grupo, é observada uma heterogeneidade genética considerável mesmo entre os tumores com diagnóstico patológico semelhante (WARDELMANN et al. 2010). Este perfil genômico complexo é detectado nos leiomiossarcomas (LMS) e os sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI).

A maioria dos marcadores observados em sarcomas de partes moles foi associada com a amplificação de genes que apresentam papel importante no desenvolvimento de tumores malignos (PARENTE et al. 1999). Ganhos em 12q13-q15 foram associados à amplificação de diversos genes mapeados nesta região como *MDM2*, *SAS*, *GLI*, *CHOP* e *CDK4* (SMITH et al. 1992; FORUS et al. 1993, 1995; WENG et al. 2003). Por outro lado, perda alélica envolvendo genes supressores

tumorais foi reportada como um evento frequente em alguns tumores, como a perda do gene *WT1* em rhabdomyosarcoma embrionário e do gene *PTEN* em sarcomas com alterações genômicas complexas (GIBAULT et al. 2010, 2012; PARENTI et al. 2012). Entretanto, foram observadas poucas regiões consistentes de perdas avaliadas por citogenética convencional incluindo deleções em 17q11-q12 e 22q11-q12 em neurofibromas, 13q em um subgrupo de lipomas e 5q21-q22 em tumores desmóides (SREEKANTAIAH 1998).

Os sarcomas apresentam uma grande complexidade biológica com um repertório de moléculas envolvidas nas vias de sinalização de progressão do ciclo celular, apoptose e fatores de crescimento (DEMICCO e LAZAR 2011). Neste contexto, recentemente as análises genômicas e moleculares em sarcomas com cariótipos complexos permitiram a identificação de novas mutações que podem ser alvos moleculares para terapias (BARRETINA et al. 2010).

A via do gene supressor de tumor *TP53*, envolvida no controle do ciclo celular e apoptose, é um exemplo destes alvos. As mutações no gene *TP53* são comumente observadas em sarcomas pleomórficos (lipossarcoma pleomórfico, leiomiossarcoma e SPI), e estão associadas com características de pior prognóstico (GUILLOU e AURIAS 2010). Em adição, a expressão aumentada de *BCL-2* (proteína anti-apoptótica) é observada em até 60% dos sarcomas, revelando assim outro mecanismo pelo qual os sarcomas podem escapar da morte celular mediada pela p53 (MAHALINGAM et al. 2009). Como a quimioterapia e a radioterapia estimulam a apoptose via p53 (via intrínseca), a interrupção dessa via pode ser responsável, pelo menos em parte, pela relativa insensibilidade dos muitos sarcomas a estes tratamentos (DEMICCO e LAZAR 2011). Por outro lado, os genes *Apo2L* e

*TRAIL* estão envolvidos na via extrínseca da apoptose, mediando a apoptose independente de p53. Estudos recentes demonstraram que receptores (*TRAIL-R1*) para estas proteínas estão expressos normalmente pela célula tumoral, e em SPM apresentaram um efeito pro-apoptótico e anti-angiogênico quando associados a quimioterápicos (WANG et al. 2010; PICARDA et al. 2010).

Em síntese, estes alvos tumor-específicos para novos quimioterápicos poderiam aumentar as opções disponíveis para o tratamento de sarcoma, assim como, reduzir os efeitos colaterais potenciais associados com abordagens atuais de tratamento (KIM et al. 2012). Além disso, a compreensão do microambiente tumoral poderia auxiliar na definição de novas condutas terapêuticas em sarcomas de partes moles.

## **1.2 SARCOMA PLEOMÓRFICO INDIFERENCIADO DE ALTO GRAU DE MALIGNIDADE (SPI)**

Os sarcomas pleomórficos de alto grau de malignidade (SPI) são tumores mesenquimais raras que exibem grande heterogeneidade histológica e um comportamento clinicamente agressivo com o desenvolvimento frequente de metástases à distância e recidivas locais (FLETCHER 2006).

No início da década de 60, o termo *Fibrohistiocitoma Maligno* (FHM) foi proposto para designar o grupo de neoplasias malignas pleomórficas que apresentava um padrão de diferenciação celular característico de histiócitos e fibroblastos, sendo classificados em cinco subtipos histológicos (OZZELLO et al. 1963; O'BRIEN e STOUT 1964). Desde os primeiros estudos, os FHM foram reconhecidos como um

grupo heterogêneo de tumores com histologia variável, destacando-se as sobreposições morfológicas dos FHM com outras lesões pleomórficas, tais como lipossarcoma e rabdomyosarcoma (KEMPSON e KYRIAKOS 1972; O'BRIEN e STOUT 1964).

Por muitos anos, os FHM foram considerados os sarcomas de partes moles mais prevalentes em adultos (WEISS e ENZINGER 1978). No entanto, estudos clínico-patológicos, ultraestruturais, imunoistoquímicas e citogenéticos revelaram que os FHM não apresentam evidência de diferenciação histiocítica verdadeira e, portanto, não representavam uma entidade única, mas uma coleção complexa de padrões morfológicos compartilhados com outras entidades de sarcomas indiferenciados (FLETCHER 1992, 2006; FLETCHER et al. 2001; COINDRE 2006).

Embora, um progresso substancial tenha ocorrido na reclassificação da maioria destas lesões, ainda existiam SPM pleomórficos não eram categorizados pelos métodos disponíveis (NASCIMENTO e RAUT 2008). Neste contexto, passou a vigorar em 2002 a nova classificação preconizada pela Organização Mundial da Saúde (WHO), na qual a antiga terminologia *Fibrohistiocitoma Maligno* foi substituída por *Sarcoma Pleomórfico Indiferenciado de Alto Grau de Malignidade/ Fibrohistiocitoma Maligno (SPI/FHM)* (FLETCHER et al. 2002). O termo FHM foi mantido na classificação de 2002, a fim de proporcionar uma oportunidade para explicar esta grande mudança conceitual. No entanto, parece muito provável que esta terminologia seja substituída por completo em futuras classificações, uma vez que tem sido reconhecido que esses tumores não têm qualquer relação com histiócitos verdadeiros (FLETCHER 2006). Como consequência desta mudança, a incidência

aparente de SPI diminuiu acentuadamente ao longo dos últimos 10 anos, representando atualmente cerca de 5% dos sarcomas de partes moles em adultos (FLETCHER 2006).

O SPI é prevalente entre a sexta e sétima década de vida, abrangendo homens e mulheres. Os sítios anatómicos mais acometidos são extremidades inferiores, seguidos por extremidade superior e retroperitônio. A doença metastática é observada em 5% dos pacientes no momento do diagnóstico, principalmente em pulmão (NASCIMENTO e RAUT 2008). Pacientes com SPI apresentam uma sobrevida estimada de cinco anos em aproximadamente 50 a 60% dos casos (FLETCHER et al. 2002; KRESSE et al. 2010). O aumento do tumor está associado com menor intervalo livre de metástase, diminuindo significativamente a sobrevida do paciente (VASILEIOS et al. 2012).

Os SPI apresentam uma heterogeneidade morfológica e citológica sendo caracterizados, na sua integridade ou em parte, por intenso pleomorfismo celular e nuclear, onde se observam células tumorais gigantes, associadas às células fusiformes e células semelhantes à histiócitos (*histiocyte-like*) em diferentes proporções ao longo da lesão. Os componentes de células fusiformes mais frequentemente observados na lesão são fibroblastos, miofibroblastos e células semelhantes a músculo liso (*smooth muscle-like*). As células tumorais são organizadas em fascículos irregulares, entrelaçados, resultando em um padrão estoriforme associado com frequência a um infiltrado de células estromais inflamatórias (FLETCHER 1992; FLETCHER et al. 2002).

Os SPI são diagnosticados usando critérios de exclusão, uma vez que não é possível determinar sua histogênese pelas ferramentas clínico-patológicas e

moleculares atualmente existentes. Dessa forma, o diagnóstico depende do tipo específico de tumor dando origem ao padrão de SPI observado em microscopia eletrônica. No entanto, como quase todos os tumores nesta categoria são pouco diferenciados (presença de células pleomórficas com características de fibroblastos não específicos ou semelhantes à histiócitos), somente uma minoria das células tumorais pode apresentar características ultraestruturais de uma linhagem específica (FLETCHER et al. 2002).

Para avaliar a patogênese dos SPI, alguns estudos investigaram o papel das células-tronco tumorais nos processos de iniciação e manutenção destes tumores. MATUSHANSKY et al. (2007) definiram pela primeira vez uma assinatura de células-tronco expressa especificamente em sarcomas pleomórficos indiferenciados. Utilizando estudos funcionais, os autores demonstraram que o gene *DKK1*, envolvido no desenvolvimento embrionário, pode favorecer o processo de transformação maligna, uma vez que atua como um inibidor do processo de diferenciação pela via WNT nas células-tronco mesenquimais. Em um estudo recente, WANG et al. (2012) demonstraram a importância das vias de sinalização Hedgehog e Notch no controle da auto-renovação de células-tronco tumorais em SPI, sugerindo que estas células alteradas estariam associadas à evasão e a resistência à quimioterapia.

### **1.3 LEIOMIOSSARCOMAS (LMS)**

Os leiomiossarcomas (LMS) são neoplasias mesenquimais malignas que representam de 10% a 15% dos sarcomas de partes moles (YANG et al. 2009;

PÉROT et al. 2010). Estas neoplasias apresentam acentuada diferenciação de músculo liso e são histologicamente compostos por células fusiformes com núcleos e citoplasma eosinofílico (LARRAMENDY et al. 2006). Em geral, estas células tumorais são positivas para actina de músculo liso (HHF-35), desmina, calponina e h-caldesmon, e negativas para miogenina (GUILLOU e AURIAS 2010).

Estas neoplasias são mais comuns em pacientes de meia-idade e idosos, sendo raramente observados em crianças. Os LMS podem se desenvolver em qualquer sítio anatômico do corpo, assim como em tecidos viscerais (próstata, bexiga urinária e útero) (GUILLOU e AURIAS 2010). Aproximadamente 50 a 65% dos LMS são detectados em retroperitônio, cavidade abdominal e mediastino, sendo que os LMS de retroperitônio e cavidade abdominal estão associados a um pior prognóstico e a sobrevida reduzida em 70 a 90% dos pacientes (MIETTINEN e FETSCH 2006).

A localização tumoral tem sido associada ao comportamento clínico destes tumores. Na maioria dos casos, os LMS localizados na derme têm melhor prognóstico quando comparados aos tumores profundos, que apresentam uma maior taxa de mortalidade associada ao aumento de recorrência local e metástases (YANG et al. 2009; GUILLOU e AURIAS 2010). Em adição, os LMS de alto grau de malignidade e intenso pleomorfismo também são lesões com pior prognóstico, associadas à maior taxa de recorrência local e metástase (FLETCHER et al. 2002).

Os leiomiossarcomas podem surgir em decorrência de infecções pelo vírus Epstein–Barr, particularmente em crianças e em pacientes imunocomprometidos (pacientes transplantados ou com síndrome da imunodeficiência adquirida-AIDS) (DEYRUP et al. 2006). Atualmente não existem terapias eficazes disponíveis direcionados para leiomiossarcomas (BECK et al. 2010).

## 1.4 ALTERAÇÕES GENÔMICAS E MOLECULARES EM SARCOMAS PLEOMÓRFICOS INDIFERENCIADOS E LEIOMIOSSARCOMAS

Um alto grau de heterogeneidade molecular e complexidade cariotípica estão presentes nos LMS, semelhante ao observado em sarcomas pleomórficos mais indiferenciados (DERRÉ et al. 2001; CARNEIRO et al. 2009; GIBault et al. 2010). Existem raros estudos em literatura sobre as alterações cromossômicas numéricas e estruturais em SPI e LMS, considerando-se a dificuldade de se obter células em mitose, associado à morfologia dos cromossomos e ao padrão de bandamento G de baixa qualidade. Os cariótipos relatados em literatura são frequentemente complexos, podendo envolver 30-35% do genoma, onde podem ser observados cromossomos em anel, associações teloméricas, *double minutes* (amplificações extra-cromossômicas), cromossomos dicêntricos, regiões homogeneamente coradas (HSR) e alterações numéricas e estruturais (MERTENS et al. 1998; LARRAMENDY et al. 2006; YANG et al. 2009; MITELMAN et al. 2010).

Entretanto, até o presente, nenhuma alteração específica foi identificada para ser utilizada como marcador diagnóstico nestes tumores. Estudos utilizando hibridação genômica comparativa cromossômica (CGH) revelaram a ocorrência de alterações genômicas onde se mapeiam genes associados ao processo tumoral, incluindo oncogenes e genes supressores de tumor. O Quadro 2 sumariza os principais estudos utilizando as metodologias baseadas na CGH em SPI e LMS.

Ganhos envolvendo 1p, 1q, 5p, 17 e 20q e perdas em 2q, 9p, 10q, 11q e 13q têm sido frequentemente relatadas em sarcomas pleomórficos indiferenciados

(FORUS et al. 1995; LARRAMENDY et al. 1997; MAIRAL et al. 1999; PARENTE et al. 1999; SIMONS et al. 2000; WENG et al. 2003; LARRAMENDY et al. 2008). Ganhos em 17q foram associados com maior sobrevida livre de doença e de baixo risco de desenvolver metástase à distância (WENG et al. 2003), enquanto os ganhos em 1q31 e 7q32 foram associados com a diminuição da sobrevida global e o aumento do risco de metástase e recorrência local, respectivamente (LARRAMENDY et al. 1997).

LARRAMENDY et al. (1997) utilizaram CGH para avaliar 58 amostras de SPI e detectaram ganhos em 1p31 (33%), 9q31 (29%), 5p14-pter (26%), 7q32 (24%), 7p15-pter (22%), 1q24 (21%) e 11q14 (21%), assim como, regiões mínimas de perdas envolvendo o cromossomo 13, particularmente em 13q21 (21%) e 13q22 (21%).

Em 20 SPI avaliados por CGH, PARENTE et al. (1999) relataram ganhos nos cromossomos 1, 2, 11, 12, 13 e 16, um alto nível amplificação em 1p31 e 12q15-q22. Perdas significativas foram observadas no cromossomo 7, particularmente em 7p15-pter, 7q21-q22 e 7q32-qter.

**Quadro 2** - Relatos publicados em sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas usando as metodologias de CGH cromossômico e CGH-array.

Entidade Tumoral	Metodologia de CGH/CGH-array	Plataforma - Número de sequências plotadas	Referência
16 SPI, 22 LS, 3 SW, 1 FBS e 12 LMS	CGH	-	Forus et al. (1995)
58 SPI	CGH	-	Larramendy et al. (1997)
20 SPI, 23 LS e 6 LMS	CGH	-	Parente et al. (1999)
30 SPI	CGH	-	Mairal et al. (1999)
34 SPI	CGH	-	Simons et al. (2000)
Linhagem COMA	CGH	-	Mairal et al. (2000)
27 LMS	CGH	-	Derré et al. (2001)
28 LMS	CGH	-	Wang et al. (2003)
39 SPI	CGH	-	Weng et al. (2003)
Linhagem FU-MFH-1	CGH	-	Nishio et al. (2003)
109 SPI	CGH	-	Chibon et al. (2003)
11 SPI	CGH	-	Coindre et al. (2004)
1 SPI	Oligoarrays	Agilent-21K	Weng et al. (2004)
21 SPI e 9 LS	CGH	-	Idbaih et al. (2005)
18 LMS	CGH	-	Hu et al. (2005)
26 SPI	CGH	-	Tarkkanen et al. (2006)

14 LMS	Oligoarrays	Agilent-13K	Larramendy et al. (2006)
18 LMS e 31 SPI	BAC-array	42K	Carneiro et al. (2009)
16 LMS e 16 SPI	BAC-array	3,8K	Pérot et al.(2009)
51 LMS	Oligoarray	Agilent-44K	Beck et al. (2010)
71 SPI, 52 LMS, 44 LPD e 16 outros SPM	BAC-array	3,8K	Chibon et al. (2010)
31 LMS e 109 SPI	BAC-array	3,8K	Pérot et al. (2010)
32 GIST e 25 LMS	Oligoarray	Agilent-44K	Yang et al. (2010)
42 GIST e 30 LMS	Oligoarray	Agilent-44K	Yang et al. (2010)
51 LMS, 70 SPI, 22 MF, 9 LPP e 8 RML	BAC-array	3,8K	Gibault et al. (2010)
44 LMS e 33 SPI	BAC-array	4,6K	Kresse et al. (2010)
55 LMS, 75 SPI, 25 MF, 9 LPP e 8 RML	BAC-array	3,8K	Gibault et al. (2012)

**Legenda:** FBS: fibrossarcoma; GIST: tumores gastrointestinais; LM: leiomiossarcoma; LPD: lipossarcoma desdiferenciado; LPP: lipossarcoma pleomórfico; MF: Mixofibrossarcoma; RML: rabiomiossarcoma pleomórfico; SPM: Sarcomas de partes moles; SP: sarcoma pleomórfico; SW: schwannoma.

Em outra análise, SIMONS et al. (2000) avaliaram 34 SPI e demonstraram alterações genômicas frequentes envolvendo ganhos em 1q21–q22 (69%), 17q23–qter (41%), e 20q (66%), e perdas em 9p21–pter (55%), 10q (48%), 11q23–qter (55%), e 13q10–q31 (55%). Os autores utilizaram *Southern blot* para avaliar a presença dos genes *CDKN2A* (9p21) e *RBI* (13q14) e confirmaram os achados de perdas por CGH neste estudo. A perda em 13q é a alteração genômica mais frequente em SPI (MAIRAL et al. 1999; SIMONS et al. 2000; CHIBON et al. 2000; DERRÉ et al. 2001). A via *Rb* está envolvida na regulação da progressão do ciclo celular. A inativação do gene supressor de tumor *RBI* e do gene *CDKN2A* (necessária para manter a ativação de Rb), são as mudanças mais frequentes descritas em SPI (MAHALINGAM et al. 2009; GUILLOU e AURIAS 2010). Outros tumores, incluindo leiomiossarcomas, tumores malignos da bainha do nervo periférico e osteossarcomas, também apresentam perda de *RBI* (GUILLOU e AURIAS et al. 2010).

TARKKANEN et al. (2006) avaliaram 26 sarcomas pleomórficos ósseos e revelaram alterações envolvendo regiões mínimas de ganhos genômicos em 8q21.3–qter (35%), 9q32–qter (35%), 7q22–q31 (35%), 1q21–q23 (31%), 7p12–pter (31%), 7cen–q11.2 (31%) e 15q21 (31%). Regiões mínimas comuns para perdas foram relatadas em 13q21–q22 (42%) e 18q12–q22 (27%). Foram observadas ampliações recorrentes nos cromossomos 1 e 8. A análise da expressão da proteína c-MYC (mapeado em 8q24) por imunistoquímica foi realizada nestas amostras revelando uma concordância entre o aumento do número de cópias em 8q24 e expressão proteica do c-MYC.

MAIRAL et al. (2000) analisaram o padrão de alterações genômicas e estruturais na linhagem celular de SPI (COMA). A análise por CGH revelou regiões mínimas de ganhos genômicos em 1q21, 5p15, 9q, 20p, 20q, 19p e 19q, assim como perdas significativas em 7p12–q21 e 13q14–qter. Outra linhagem de células de SPI analisada por CGH foi a FU-MFH-1 (NISHIO et al. 2003). Os achados revelaram ampliações no cromossomo 12, particularmente em 12q13–q21. Além disso, ganhos significativos foram observados em 5p15.3, 6q11–q14 e 8q12–q21.2 e perdas em 9q31–q33.

CHIBON et al. (2003) analisaram pela CGH uma série de 109 amostras de SPI utilizando um software delineado para agrupamentos, na tentativa de classificar estes tumores. Foi observado um alto nível de ampliações em 12q14–q15 associado com a amplificação em 1p32 ou 6q23. Estes achados são similares aos descritos em lipossarcomas bem-diferenciados sugerindo que SPI são lipossarcomas dediferenciados. Em adição, os autores sugeriram que a perda de diferenciação nestes tumores pode ser consequência de ampliações em genes localizados tanto em 1p32 como em 6q23, como o gene *ASK1* (mapeado em 6q23) amplificado nestes tumores.

Em leiomiossarcomas, os estudos de CGH revelaram alterações genômicas recorrentes envolvendo ganhos nos cromossomos 1, 5, 6, 8, 15, 16, 17, 19, 20, 22, perdas nos cromossomos 1p, 2, 3, 4, 6q, 8, 9, 10p, 11p, 12q, 11q, 13, 16, 17p, 18, 19, 22q e ampliações nos cromossomos 1, 5, 8, 12, 13, 17, 19, 20 (FLETCHER et al. 1999; SANDBERG 2005; YANG et al. 2009). Algumas alterações foram associadas com pior prognósticos, tamanho tumoral e disseminação metastática, incluindo as perdas em 13q14–q21. Ganhos em 5p14–pter foram relacionados à sobrevida

diminuída (WANG et al. 2003). As perdas em 2p, 10q e 12p, assim como ganhos em 1q, 5p e 17p, foram associados com o desenvolvimento mais agressivo dos LMS (HU et al. 2001, 2005).

ESPINOSA et al. (2011) avaliaram o padrão de expressão das proteínas CSF1 e a presença de infiltrado macrofágico associado ao tumor (TAM) em um TMA contendo 149 amostras de LMS. Os resultados obtidos sugeriram uma importante associação entre a expressão de CSF1 e a presença de infiltrado TAM com a angiogênese patológica em LMS. Em adição, a expressão de *CSF1* foi associada com pior prognóstico em um subgrupo de LMS (LEE et al. 2008; ESPINOSA et al. 2009). Alguns marcadores moleculares que afetam o prognóstico de pacientes em SPI e LMS foram compilados no Quadro 3.

**Quadro 3** - Marcadores moleculares que afetam o prognóstico de pacientes em SPI e LMS.

Referência	Marcador	Subtipo Histológico	Marcador de expressão	Valor prognóstico
Konomoto et al. (1998)	<i>TP53</i>	LMS	Expressão do gene <i>TP53</i>	Pior prognóstico
Kawaguchi et al. (2003)	<i>CDKN2A</i>	LMS	Ausência de expressão do gene <i>CDKN2A</i>	Pior prognóstico
Kawaguchi et al. (2004)	<i>DAP kinase, TP53</i>	LMS	Expressão do gene <i>DAP kinase</i>	Pior prognóstico
Francis et al. (2007)	Genes associados à hipóxia ( <i>HIF1A</i> )	SPI	Aumento da expressão de genes associados à hipóxia	Metástase à distância
Maeda et al. (2008)	<i>CXCR4</i>	SPI	Aumento de expressão do gene <i>CXCR4</i>	-
Tsiatis et al. (2009)	<i>MYC</i>	LMS	Expressão do gene <i>MYC</i>	Pior prognóstico
Lahat et al. (2011)	<i>MAP2K1, AKT1</i>	SPI	Aumento da expressão dos genes <i>MAP2K1</i> e <i>AKT1</i>	Pior prognóstico
Carneiro et al. (2009)	<i>EZR</i>	LMS, LPS, SS e UPS	Expressão do gene <i>EZR</i>	Recorrência local e metástase a distancia

Fonte: Adaptado de PENNACCHIOLI et al. (2012).

Diferente da CGH cromossômica, a metodologia de CGH-*array* permite a identificação precisa da região e dos genes envolvidos em perdas heterozigotas e homozigotas, ganhos e ampliações, podendo ser utilizada como estratégia metodológica para classificar diferencialmente os sarcomas pleomórficos indiferenciados de outros sarcomas, incluindo leiomiossarcomas.

Utilizando CGH-*arrays* em uma plataforma contendo 21.632 sequências de cDNA humanos, WENG et al. (2004) demonstraram ganhos significativos em 6q21-q23, 8p21-pter, 8q24-qter, e 12q13-q21, sugerindo a presença de oncogenes mapeados nestas regiões e relacionados com a tumorigênese dos SPI. Os mesmos autores relataram previamente a associação de ganhos em 17q, particularmente 17q21, com sobrevida aumentada e baixa incidência de metástase em pacientes com SP (WENG et al. 2003). NAKAYAMA et al. (2007) avaliaram o padrão de expressão gênica em larga escala (cDNA microarray) em 105 amostras classificadas em 10 subtipos de sarcomas. Os resultados obtidos confirmaram a heterogeneidade do perfil de expressão gênica dos SP e concluíram que a maioria destas neoplasias pode ser reclassificada em subtipos pleomórficos de outros sarcomas.

Novas informações moleculares podem levar à reclassificação de muitos tipos tumorais. Neoplasias previamente classificadas como SPI mostraram ter padrões de expressão gênica similares a outros tumores, principalmente leiomiossarcomas e lipossarcomas (COINDRE et al. 2004; CARNEIRO et al. 2009; GIBault et al. 2010). FLETCHER et al. (2001) reclassificaram por métodos histológicos 100 amostras previamente classificadas como SPI e demonstraram que o diagnóstico mais comum foi de mixofibrossarcomas (n=29), seguido por leiomiossarcomas (n=20). Em uma reavaliação destes achados, outro estudo comparou amostras de SPI

em leiomiossarcomas utilizando imunohistoquímica para diversos marcadores de músculo liso (desmina, actina músculo liso-SMA, actina músculo-específica). O exame de microscopia eletrônica revelou que aproximadamente metade dos casos de SPI apresentava uma proporção de células miofibroblásticas e a outra metade das amostras apenas fibroblastos ou células tumorais desdiferenciadas. Dessa forma, a maioria das amostras de SPI não apresentou características de diferenciação para os marcadores de músculo liso e miofibroblastos, sugerindo que estes tumores poderiam ser agrupados como mixofibrossarcomas e leiomiossarcomas pleomórficos (HASEGAWA et al. 2003).

Em estudo realizado por BAIRD et al. (2005), a análise de clusterização hierárquica não-supervisionada em amostras de SPI identificou dois grupos distintos: tumores com perfil muscular (miosina X, sarcoglicanas  $\beta$ , tenascina C) e um segundo grupo revelou um perfil com genes associados resposta imune (*HEM1*, *MX1*, *DAP10*). Os subtipos mixóide e pleomórfico-estoriforme foram agrupados nestes dois grupos de tumores, sugerindo que a distinção entre os SPI com diferenciação miogênica e características inflamatórias pode ser de relevância clínica (BAIRD et al. 2005).

Alterações genômicas similares e uma sobreposição de fenótipos baseados na expressão de proteínas por imunohistoquímica foram descritas nos SPI e LMS, sugerindo a existência de uma via oncogênica comum nestes dois grupos (PÉROT et al. 2010). A revisão realizada por GUILLOU e AURIAS (2010) compilou os principais estudos utilizando hibridação genômica comparativa cromossômica (CGH) em SPI e LMS. Estes estudos revelaram que genes localizados nestas regiões poderiam estar envolvidos nestes processos tumorais incluindo perdas em 1q32.1,

2p25.3, 2q36-q37, 8p23, 9p, 10q21-q23, 11q22, 13q14-q21, 16q11 e 16q23; ganhos em 1p36-p31, 1q21-q24, 2p, 4p16, 5p, 5q34, 6q, 7p15-p22, 7q21-qter, 17q, 9q, 14q, 16p13, 17q, 19p13, 19q13.11-q13.2, 20q e 21q, assim como, alto nível de ganhos nos loci 1p33-p34, 12q13-q15, 17cen-p11.2 e 17p13-pter (DERRÉ et al. 2001; LARRAMENDY et al. 2008; CARNEIRO et al. 2009).

Entre estas alterações comuns, foram descritas as deleções envolvendo os cromossomos 10 e 13, sugerindo a participação dos genes supressores tumorais *PTEN* e *RBI*, respectivamente (CHIBON et al. 2000; HU et al. 2005; GUILOU et al. 2011). Em adição, a deleção no cromossomo 17 e/ou mutações do gene *TP53* também são eventos frequentemente associados à sarcomatogênese (YOO et al. 1997; PÉROT et al. 2010; ITO et al. 2011).

Apesar das análises citogenéticas em literatura terem revelado alterações genômicas complexas, nenhuma evidência de alteração cromossômica específica foi observada em sarcomas pleomórficos, dificultando a identificação e a caracterização clínica destes tumores. Assim, uma abordagem citogenética molecular aliada ao conhecimento da biologia do tumor, poderiam ser parâmetros úteis ao diagnóstico e prognóstico dos SPI.

## 2 JUSTIFICATIVA

Os sarcomas pleomórficos indiferenciados de alto grau são neoplasias malignas agressivas que apresentam um comportamento clínico variável. Estudos recentes utilizando várias abordagens metodológicas demonstraram que este tumor não apresenta diferenciação histiocítica verdadeira e, portanto, não representa uma única entidade, mas um grupo heterogêneo de subtipos pleomórficos de outros sarcomas. Entretanto, até o momento, não foi estabelecido nenhum marcador útil para o diagnóstico clínico destes tumores, sendo que a distinção entre os diferentes subtipos é realizada pela aparente ausência de diferenciação específica. Além disso, estes tumores não apresentam um comportamento biológico distinto, particularmente quanto à recorrência local e metástase. As características clínico-patológicas dos SPI, apesar de apresentarem uma diferença histológica, podem ser estritamente relacionadas com outros sarcomas pleomórficos, particularmente os leiomiossarcomas. Neste estudo, foi realizada a triagem de alterações genômicas em amostras de SPI e LMS utilizando a metodologia de CGH-*array*. Os resultados obtidos foram comparados com o seguimento clínico dos pacientes e dados histopatológicos dos tumores. A caracterização molecular destes tumores pode levar a identificação de genes candidatos a marcadores para o diagnóstico e prognóstico diferencial entre os SPI e LMS.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar o perfil de alterações no número de cópias genômicas (ganhos e perdas) para a determinação de candidatos a biomarcadores em sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar um subconjunto de genes mapeados nas regiões alteradas;
- Comparar as sequências genômicas alteradas com informações disponíveis em bancos de dados para avaliar a função de genes selecionados e determinar seu envolvimento em vias e redes biológicas associadas ao desenvolvimento de sarcomas humanos;
- Associar os resultados da pesquisa com os dados clínicos e histopatológicos de cada paciente (seguimento clínico, desenvolvimento de metástase à distância, presença de recorrência local, grau de diferenciação histológico e estadiamento clínico).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

A casuística selecionada foi de 111 casos, porém, após revisão histológica e dos prontuários, verificou-se que 67 amostras eram provenientes de pacientes que receberam tratamento prévio ou em que não foi possível a obtenção de DNA de qualidade ou quantidade suficiente para o estudo. A casuística final deste projeto compreendeu 37 amostras de tecidos congelados, pertencentes a 36 pacientes, incluindo 20 sarcomas pleomórficos indiferenciados e 17 leiomiossarcomas. Os espécimes utilizados neste estudo fazem parte do Banco de Tumores do Hospital A. C. Camargo (33), SP e do Hospital de Câncer de Barretos (4), SP e foram coletadas entre 2000 e 2010. Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa de ambos os Hospitais (CEP HACC 1105/08 e CEP HCB 307/2010). As alíquotas de ácidos nucléicos foram obtidas do Banco de Amostras do Hospital AC Camargo, São Paulo - SP, sob responsabilidade da Dra. Dirce Carraro. Aquelas obtidas do Hospital de Câncer de Barretos, SP contaram com a colaboração do Dr. André Lopes Carvalho e Dr. Cristovam Scapulatempo Neto.

Todos os casos foram reavaliados pela patologista Dra. Isabela da Cunha Werneck, Departamento de Patologia, Hospital AC Camargo, SP. O critério diagnóstico foi baseado nas recomendações da Organização Mundial da Saúde e levou em consideração a morfologia e os resultados da análise da expressão de proteínas específicas por imunohistoquímica (FLETCHER et al. 2002). O grau

histológico foi definido segundo as recomendações da *Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer* (FNCLCC), que utiliza três variáveis: índice mitótico, necrose tumoral e diferenciação celular (GUILLOU et al. 1997).

## **4.2 EXTRAÇÃO DE DNA**

As amostras de DNA foram obtidas para a realização dos experimentos de CGH-array. O método de isolamento do DNA consistiu na digestão da amostra com proteinase K, extração das proteínas e dos ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos (fenol/clorofórmio) e precipitação com etanol 100%.

Após a extração do DNA, as amostras foram tratadas com RNase A de acordo com protocolo do *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre Biotechnologies) com o objetivo de eliminar RNA contaminante capaz de inibir a quantificação e com qualidade para as reações de hibridação. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) e a qualidade foi avaliada em gel de agarose 0,8%.

## **4.3 CGH-ARRAY (ARRAY-BASED COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION)**

### **4.3.1 Marcação das Amostras**

As alterações no número de cópias de DNA foram gerados utilizando-se a plataforma *Human Genome CGH Microarray 4x44K* (Agilent), a qual contém sequências com 60pb com um espaçamento médio de aproximadamente 74Kb. Essa

plataforma possui aproximadamente 45.015 sondas que mapeiam genes bem caracterizados, particularmente envolvidos em câncer, assim como, sequências codificadoras e não codificadoras (<http://www.chem.agilent.com>). O DNA genômico comercial masculino (Promega), o qual é constituído por DNA proveniente de múltiplos doadores, foi utilizado como referência nos experimentos.

Para a realização dos experimentos foram utilizados 500ng de DNA e a marcação das amostras baseou-se no padrão de qualidade apresentado em gel de agarose 0,8%. Amostras tumorais com banda de DNA intacta foram submetidas à marcação pelo Kit *Agilent Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit* (Agilent), de acordo com especificações do fabricante. Inicialmente foi realizada uma diluição para um volume final de 22,2  $\mu\text{L}$  e as amostras foram submetidas a uma etapa de digestão enzimática randômica em reação contendo 2,3 $\mu\text{L}$  de *10x Buffer C*, 0,2 $\mu\text{L}$  BSA Acetilado e 0,5 $\mu\text{L}$  das enzimas *AluI* e *RsaI* (Prodimol), totalizando 26 $\mu\text{L}$  de volume da reação. As reações contendo amostras tumorais foram incubadas a 37°C por um período que variou de 1 a 2 horas, dependendo da integridade da banda de DNA em gel de agarose, e 65°C por 20 min. A reação contendo o DNA de referência foi incubada a 37°C por 2 horas e 65°C por 20 min em todos os procedimentos. Em seguida, foram adicionados 5 $\mu\text{L}$  de *Random Primer* e as amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 min e transferidas para o gelo. A marcação foi realizada com a adição de 10 $\mu\text{L}$  de *5x Buffer*, 5 $\mu\text{L}$  do dNTP mix, 1 $\mu\text{L}$  da enzima *Exo-Klenow* e 3 $\mu\text{L}$  de Cy3 dCTP para amostras tumorais e Cy5 dCTP para a referência (Amersham). As reações foram incubadas a 37°C por 2 horas, 65°C por 10 min e mantidas em gelo. A purificação foi realizada em mini-colunas de celulose

(Microcon YM-30, Millipore) de acordo com instruções do fabricante e eluídas em 50µL de TE (tampão Tris-EDTA); 1x pH 8,0 (Prodimol).

#### **4.3.2 Hibridação e Lavagem**

A intensidade de marcação e o rendimento da reação foram avaliados para todas as amostras utilizando o NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) sendo combinadas as amostras tumoral e referência com eficiências de marcação semelhantes. Adicionou-se a cada reação *Human Cot* DNA humano (Invitrogen), 10X *aCGH Blocking Agent* (Agilent) e 2X *Hi-RPM Hybridization Solution* (Agilent). A mistura de hibridação foi desnaturada a 95°C por 3 min e incubada a 37°C por 30 min em banho seco. Foram adicionados 100uL da mistura final às lâminas. A lavagem das mesmas ocorreu em banhos consecutivos nas soluções de *Wash Buffer 1* por 5 min, *Wash Buffer 2* por 1min, Acetonitrila por 10seg e *Stabilization and drying solution* por 30 seg.

#### **4.3.3 Extração e Análise dos Dados de *Cgh-Array***

A captura das imagens foi obtida após o uso do *DNA microarray Scanner with SureScan High Resolution Technology* (Agilent Technologies) e o *Scan Control Software* 8.1. Foi utilizado o *Software Feature Extraction* v10.1.1.1 (Agilent Technologies) para a extração dos valores de intensidade a partir das imagens geradas pelo sistema. O programa também possibilita a aplicação de testes de qualidade das hibridações (relatórios *QC Reports*). Este procedimento também faz as correções necessárias dos valores de intensidade provenientes de cada corante (usando o algoritmo Lowess), para eliminar as diferenças de eficiência da emissão

dos corantes fluorescentes Cy3 e Cy5; assim como a subtração do *background* local (valor de intensidade ao redor de cada *spot*).

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa *Nexus version 6.0* (Biodiscovery). Este programa executa dois níveis de análise computacional: (1) O primeiro identifica as regiões de ganho ou perda em uma única amostra; este processo é comumente referido como segmentação. O próximo nível combina os resultados de todas as amostras para responder a questões mais elaboradas referentes à população. Por exemplo, qual é a região mínima de sobreposição entre as amostras, quais vias são afetadas nesta região aberrante. Em adição, cada sonda na plataforma se refere a uma região do genoma e esta informação de mapeamento está disponível para o *software*, juntamente com os valores de intensidade de cada sonda obtidos nos experimentos (tumor x controle). Dessa forma, o algoritmo de segmentação realiza a compilação destas informações, permitindo a avaliação da razão logarítmica ( $\log_2$ ) da intensidade normalizada do número de cópias entre amostra alvo (tumoral) em relação à amostra referência (controle).

Para a análise dos dados foi utilizado o algoritmo *FASST2* (*Fast Adaptive States Segmentation Technique 2*), considerando-se o limiar de significância de  $1,00E^{-5}$  e o máximo espaçamento entre sondas adjacentes antes de realizar a quebra de um segmento de 1Mb. Foram consideradas cinco sondas consecutivas alteradas para a determinação de um segmento como alterado quanto ao número de cópias. Os limiares considerados para ganhos de uma cópia, ganhos de duas ou mais cópias (alto nível de ganhos), perdas de uma cópia e perdas de duas cópias (deleção homozigota) foram 0,2; 0,6; -0,2 e -1,0, respectivamente. As amostras foram agrupadas com a utilização do algoritmo *Complete Linkage Hierarchical* e os cromossomos sexuais

foram excluídos da análise. O algoritmo *STAC* (*Significance Testing for Aberrant Copy Number*) foi usado para identificação da frequência global de alterações no número de cópias (DISKIN et al. 2006).

As regiões alteradas foram comparadas a CNVs (do inglês, *Copy number variations*) presentes no DGV (do inglês, *Database of Genomic Variants*; <http://projects.tcag.ca/variation/>) e posteriormente classificados como comuns (regiões com tamanho superior a 100kb e presentes no DGV com frequência maior ou igual a 1%), raras (regiões com tamanho superior a 100kb e presentes no DGV com frequência menor ou igual a 1%) e novas raras (regiões com tamanho superior a 100kb e ausentes no DGV).

#### **4.4 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)**

Para a análise de qPCR foram desenhados oito pares de iniciadores (*primers*) representativos de quatro genes que se encontravam alterados na análise de CGH-*array* (*ARNT-P1*, *ARNT-P2*, *ARNT-P3*, *PBXIP1-P1*, *PBXIP1-P2*, *SLC27A3-P1*, *CCND1-P1* e *CCND1-P2*). As sequências genômicas de DNA de regiões candidatas foram obtidas a partir do *website Ensembl Genome Browser* (GRCh37/hg19 *Human Reference Assembly*; Fevereiro de 2009). A Tabela 1 apresenta os dados das sondas e as sequências dos iniciadores utilizados para a análise de qPCR.

Os iniciadores foram desenhados usando o programa Primer-Blast (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). As curvas-padrão foram realizadas para determinação da eficiência de amplificação (90-110%), usando cinco pontos de diluições seriadas de amostras de DNA (1:4, de 80ng a 0,31ng). Para

maior precisão das reações de amplificação, foi utilizado o pipetador automático *QIAgility* (Qiagen, Courtaboeuf, France). As reações foram realizadas em um volume total de 12,5µL contendo *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems; Foster City, CA), 20ng de DNA e 200nM de cada iniciador (*forward e reverse*). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e submetidas às seguintes condições: aquecimento inicial de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto. Para as reações foi utilizado o equipamento *7500 Real time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA). A qualidade de amplificação foi verificada pela análise da curva de dissociação (avaliação da especificidade) e comparação de variações nas duplicatas, onde amostras que apresentaram diferenças no valor de quantificação do ciclo (Cq) maior do que 0,5 foram reavaliadas. Um *pool* de DNA de amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis foi incluído em todas as placas para cada par de iniciadores testado (referência calibradora entre cada placa).

**Tabela 1** - Genes selecionados para as ampliações pela qPCR e os iniciadores testados para cada um deles.

Identificação da Sonda *	Marcadores	Sequências dos iniciadores ( <i>Primers</i> )
<i>ARNT</i>		
A_14_P136306	ARNT_P 1	F: 5'-GATAAGGAGCGGTTTGCCAGGTA-3' R: 5'-AGTCAATATGCTAGGACTGTCTGGT-3'
A_14_P138897	ARNT_P 2	F: 5'-TCTCCCGACACAACATTGAGGGT-3' R: 5'-TGGTAGCCAACAGTAGCCACACA-3'
A_14_P135828	ARNT_P 3	F: 5'-ACCTGGATGGGGCTTCTCTTTCT-3' R: 5'-TAGGCTGTCATCTTGTTCGTCG-3'
<i>PBXIP1</i>		
A_14_P200039	PBXIP1_P 1	F: 5'-TCAGGGACCTCAGCAACTATGGC-3' R: 5'-GACCCACCAAGAAAGAAGCCCAG-3'
A_14_P135389	PBXIP1_P 2	F: 5'-AGGGAAGGGTGGAGATTAGACAGCA-3' R: 5'-CACCTCTTCTCCCAAGCCAGCA-3'
<i>SLC27A3</i>		
A_14_P120830	SLC27A3_P 1	F: 5'-GGTAAGCCAGCAGTCCCCATT-3' R: 5'-ACATCCTTTAGCAACTTCCCCTGG-3'
<i>CCND1</i>		
A_14_P124581	CCND1_P 1	F: 5'-CGCCCTCGGTGTCCTACTTCA-3' R: 5'-TAAGAGAGCCGCCCGAAGCC-3'
A_14_P102675	CCND1_P 2	F: 5'-TGGGGTGTACTTGGTCTGTGCT-3' R: 5'-GCTTGGCTCACTCGGGAAGG-3'

**Legenda:** \*Identificação da sonda presente na plataforma de 4 x 44K microarrays (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, G4413A).

Dez amostras de DNA obtidos de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram incluídas como uma referência de controle biológico, em adição às amostras tumorais (16 SP e 11 LMS) previamente avaliadas na análise de CGH-array. O número relativo de cópias do DNA foi obtido utilizando o *GAPDH* como gene-referência, de acordo com o modelo de *Delta-delta Cq* (LIVAK e SCHMITTGEN 2001), conforme as equações descritas abaixo:

- I.  $\Delta Cq_{(teste)} = Cq_{(teste, alvo)} - Cq_{(Teste, referência)}$
- II.  $\Delta Cq_{(calibradora)} = Cq_{(calibrador, alvo)} - Cq_{(calibrador, referência)}$
- III.  $\Delta\Delta Cq_{(teste; calibradora)} = \Delta Cq_{(teste)} - \Delta Cq_{(calibrador)}$
- IV.  $QR = 2^{-\Delta\Delta Cq}$

Onde:

$\Delta Cq$  = Diferença entre o  $Cq$  obtido para os genes alvo e referência realizado para a amostra calibradora e a amostra teste;

$\Delta\Delta Cq$  = Diferença entre o  $\Delta Cq$  da amostra teste com o  $\Delta Cq$  da amostra calibradora;

**QR** = Valor da quantificação relativa do número de cópias do DNA normalizado.

Ao final, o QR das amostras foi dividido pela mediana do QR das referências biológicas (n=10) para cada gene alvo, de modo a permitir a normalização dos valores de acordo com estes controles. Baseado no valor teórico para células diplóides, o intervalo de número de cópias estabelecido foi 0,5 para perda de uma cópia e 1,5 para ganho de uma cópia. Devido a variações técnicas, acrescentou-se 10% ao valor esperado para perda ( $\leq 0,55$ ) e diminuiu-se 10% do valor esperado para ganho ( $\geq 1,35$ ). O intervalo entre esses valores foi considerado como normal.

#### 4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As comparações entre os diferentes grupos baseados em dados clínico-patológicos e alterações moleculares foram realizadas no programa *Nexus Copy Number software version 6.0* (Biodiscovery, Inc., El Segundo, CA, USA) com a utilização do teste exato de Fisher e teste t Student com valor de  $P < 0,05$  para determinação de significância. A associação entre as alterações moleculares significativas nos grupos tumorais e a sobrevida foi realizada pelo método de Kaplan-Meier (teste de Log rank) nos 37 casos com dados disponíveis. A sobrevida global (OVS) foi calculada considerando o tempo de seguimento dos pacientes, que

variou de 22,1 e 38,8 meses para a SPI e LMS, respectivamente. As análises estatísticas dos dados para qPCR foram realizadas usando *Graphpad Prism 5* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Foi realizada uma análise multivariada utilizando de regressão de Cox.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS**

As 37 amostras tumorais incluídas neste estudo foram provenientes de biópsias (seis casos), ressecção do tumor primário (20 casos) e de recidivas (11 casos). Nos casos de recidiva, a lesão primária foi operada em outro serviço. Em todos os casos, os pacientes não receberam tratamento quimioterápico ou radioterápico prévios à obtenção da amostra. Um paciente foi diagnosticado como portador da Síndrome de Li-Fraumeni (LMS22) pelo Serviço de Oncogenética do Hospital do Câncer AC Camargo, SP. A idade média dos pacientes foi de 59,3 anos (variando de quatro a 90 anos); sendo 15 do sexo feminino e 22 do sexo masculino. Uma parcela significativa destes tumores localiza-se no retroperitônio (13 casos) e nas extremidades inferiores (14 casos). A maioria dos casos foi classificada como de alto grau histológico (G2 e G3), sendo que apenas dois casos de LMS (LMS15 e LMS21) foram classificados como de baixo grau (G1). O tempo médio de seguimento clínico foi de 29,8 meses (variando de um a 109 meses). Quinze pacientes receberam apenas tratamento cirúrgico (cinco SPI e 10 LMS), seis foram submetidos a tratamento neoadjuvante (quatro SPI e dois LMS) e 16 foram submetidos a tratamento adjuvante (11 SPI e cinco LMS). A Tabela 2 sumariza as informações clínico-patológicas de cada paciente.

**Tabela 2** - Dados clínicos e patológicos dos pacientes incluídos no estudo: 20 sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI) e 17 leiomiossarcomas (LMS).

Caso	Idade	Sexo	Origem do material coletado	Topologia	TNM	Grau Histológico	Recorrência local	Metástase à distância	Tratamento (QT ou RT)	Seguimento (meses)
SP 1*	51	F	Recorrência	Extremidade inferior	T1aN0M0	III	Presente	-	0	VSD (108)
SP 2*	52	F	Recorrência	Retroperitônio	T2bN0M0	III	Presente	-	2	OPD (33)
SP 3*	49	M	Recorrência	Retroperitônio	T2bN0M0	III	Presente	-	2	OPD (22)
SP 4*	90	M	Tumor primário	Extremidade inferior	T2aN0M0	III	-	-	2	OPD (8)
SP 5	50	M	Recorrência	Retroperitônio	T2bN0M0	III	Presente	-	2	OPD (8)
SP 6	56	M	Tumor primário	Extremidade inferior	T2bN0M0	III	-	-	2	VSD (44)
SP 7*	58	F	Recorrência	Cabeça e pescoço	T2aN0M0	III	Presente	-	2	VSD (29)
SP 8 <sup>a</sup> *	63	M	Tumor primário	Cabeça e pescoço	T1aN0M0	III	-	-	2	OPD (15)
SP 9*	72	M	Tumor primário	Extremidade inferior	T2bN0M0	III	-	-	1	VSD (30)
SP 13*	63	M	Recorrência	Extremidade inferior	T2bN0M0	III	Presente	Pulmão	1	OPD (18)
SP 14*	32	F	Tumor primário	Tronco	T1aN0M0	III	-	-	0	VSD (30)
SP 15*	80	M	Recorrência	Retroperitônio	T2bN0M0	III	Presente	-	0	VSD (11)
SP 16*	60	M	Tumor primário	Tronco	T2aN0M0	III	-	-	1	VSD (1)
SP 17	56	M	Tumor primário	Extremidade inferior	T2bN0M0	III	-	-	1	VSD (20)
SP 18 <sup>a</sup>	63	M	Tumor primário	Extremidade inferior	T2bN0M1	III	-	Pulmão e adrenal	2	OPD (7)
SP 19	77	M	Tumor primário	Extremidade superior	T2bN0M0	III	-	-	2	VSD (33)
SP 20*	41	M	Tumor primário	Retroperitônio	T2bN0M0	III	-	-	2	VSD (6)
SP 21*	82	F	Tumor primário	Extremidade inferior	T2bN0M0	III	-	-	0	OPD (3)
SP 22*	78	M	Tumor primário	Extremidade superior	T2bN0M0	III	Presente	Pulmão	0	VCD (11)
SP 23*	60	M	Recorrência	Extremidade inferior	T2aN0M0	III	Presente	Pulmão e ossos	2	VCD (5)
LMS 3	60	F	Recorrência	Extremidade superior	T1aN0M0	II	Presente	-	0	VSD (64)
LMS 4*	89	F	Recorrência	Tronco	T2bN0M0	II	Presente	Pulmão	0	OPD (12)
LMS 5	77	F	Tumor primário	Tronco	T2bN0M0	III	-	Pelvis	0	OPD (54)
LMS 6	54	F	Tumor primário	Retroperitônio	T2bN0M1	III	Presente	Fígado	2	OPD (15)
LMS 7*	37	M	Tumor primário	Extremidade inferior	T1aN0M0	III	-	-	1	VSD (45)

<b>LMS 8</b>	61	F	Tumor primário	Retroperitônio	T2bN0M0	III	-	-	0	OPD (28)
<b>LMS 9</b>	62	M	Tumor primário	Extremidade inferior	T2bN0M0	II	-	-	2	VSD (99)
<b>LMS 15*</b>	49	M	Tumor primário	Extremidade inferior	T2bN0M0	I	-	-	0	VSD (65)
<b>LMS 16*</b>	50	M	Recorrência	Retroperitônio	T2bN0M0	III	Presente	-	0	VSD (109)
<b>LMS 17</b>	48	M	Tumor primário	Retroperitônio	T2bN0M0	III	-	-	0	VSD (4)
<b>LMS 18*</b>	61	M	Tumor primário	Retroperitônio	T2bN0M0	III	Presente	Peritônio	2	VCD (36)
<b>LMS 19<sup>b*</sup></b>	4	M	Tumor primário	Extremidade inferior	T2bN0M0	III	-	-	2	VSD (25)
<b>LMS 20*</b>	81	F	Tumor primário	Extremidade inferior	T2bN0M1	III	-	Pulmão e parede abdominal	1	OPD (10)
<b>LMS 21*</b>	52	F	Tumor primário	Retroperitônio	T2bN0M0	I	-	-	0	VSD (23)
<b>LMS 22<sup>b*</sup></b>	74	F	Tumor primário	Retroperitônio	T2bN0M0	II	-	-	0	VSD (2)
<b>LMS 23*</b>	45	F	Tumor primário	Retroperitônio	T2bN0M0	III	Presente	-	0	VSD (21)
<b>LMS 24*</b>	58	F	Tumor primário	Extremidade superior	T2aN0M0	III	-	-	2	VSD (48)

**Legendas** – VCD: Vivo com doença; VSD: Vivo sem doença; OPD: Óbito pela doença.

0: Cirurgia; 1: Neoadjuvante; 2: Adjuvante.

<sup>a</sup> Tumores pertencentes ao mesmo paciente.

<sup>b</sup> Pacientes com a Síndrome de Li-Fraumeni.

\*Casos usados para validação por PCR quantitativa em tempo real.

Todos os casos de sarcomas de alto grau histológico com morfologia fusocelular e pleomórfica, negativos para os imunomarcadores musculares (como AML, HHF35 e desmina), vasculares (CD34, CD31), epiteliais (EMA e citoceratinas) e de diferenciação neural (proteína S100) foram classificados como Sarcomas Pleomórficos indiferenciados (SP2, SP4, SP9, SP15, SP20, SP21, SP22 e SP23). Foram também considerados como SPI os casos com morfologia totalmente pleomórfica e expressão apenas focal de marcadores musculares (SP7, SP14, SP17, SP18 e SP19). Não foram realizadas análises de imunoistoquímica nos casos SP3, SP5 e SP8, porém, a morfologia completamente pleomórfica permitiu sua classificação como SPI.

Os casos de leiomiossarcomas apresentaram morfologia variando da forma clássica de feixes entrecortados até uma morfologia mais pleomórfica, mas mantendo expressão moderada de marcadores musculares (AML, HHF35 ou desmina). Casos com morfologia pleomórfica, mas com áreas de feixes associados à expressão focal de marcadores musculares (AML, HHF35 ou desmina) foram considerados como LMS (LMS6, LMS7, LMS16 e LMS20).

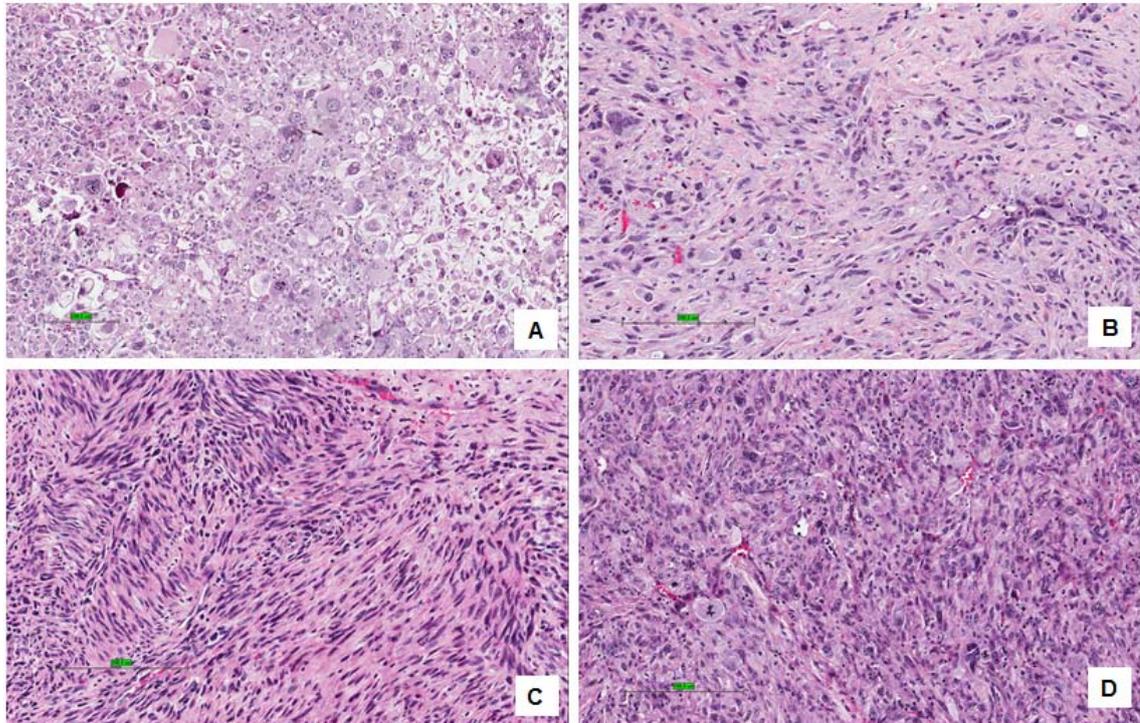
Três sarcomas pleomórficos indiferenciados (SP1, SP13 e SP16) apresentaram áreas mixóides focais, podendo eventualmente corresponder a mixofibrossarcomas de alto grau histológico. Um caso (SP6) de extremidade inferior, embora classificado como SPI, poderia também ser classificado como lipossarcoma mixóide. Entretanto, como não foram observados componentes de lipossarcomas bem diferenciados justapostos, e após exaustiva análise histopatológica, este foi classificado como SPI.

Os resultados da análise imunoistoquímica utilizando marcadores proteicos, assim como, exemplos representativos dos aspectos morfológicos de alguns casos que compõem este estudo estão apresentados na Tabela 3 e na Figura 1, respectivamente.

**Tabela 3** - Resultados da análise imunoistoquímica utilizando marcadores proteicos relacionados com a função muscular.

<b>Casos</b>	<b>Marcadores proteicos avaliados por imunoistoquímica</b>
SP1	Não testado
SP2	AML - / Desmina - / HHF-35 -
SP3	Não testado
SP4	Desmina - / HHF-35 -
SP5	Não testado
SP6	AML -
SP7	AML + focal / Desmina - / HHF-35 + focal
SP8	Não testado
SP9	AML -
SP13	AML - / Desmina - / HHF-35 - / Caldesmon -
SP14	AML + focal
SP15	AML - / Desmina -
SP16	AML + focal / Desmina -
SP17	AML + focal / Desmina + focal
SP18	AML + focal / HHF-35 + focal
SP19	AML + focal / Desmina + focal / HHF-35 -
SP20	Desmina - / HHF-35 -
SP21	Desmina - / HHF-35 - / Calponina + focal
SP22	Desmina -
SP23	Desmina - / HHF-35 -
LMS3	Não testado
LMS4	AML + / HHF-35 +
LMS5	AML + / Desmina - / HHF-35 -
LMS6	AML + / Desmina -
LMS7	AML + / Desmina +
LMS8	Desmina - / HHF-35 +
LMS9	AML + focal / Desmina + / HHF-35 + focal
LMS15	AML + / Desmina + / HHF-35 + / Calponina +
LMS16	AML + difuso / Desmina + difuso
LMS17	AML + / Desmina + / HHF-35 +
LMS18	AML + / Desmina +
LMS19	AML + / Desmina - / HHF-35 +
LMS20	AML + / Desmina + focal
LMS21	AML + / Desmina +
LMS22	AML + / Desmina +
LMS23	AML + / Desmina + / Caldesmon +
LMS24	Desmina + / HHF-35 + focal

**Legenda:** +: imunomarcagem positiva, -: imunomarcagem negativa. Análise realizada sob a responsabilidade da Dra Isabela da Cunha Werneck, Departamento de Patologia, Hospital A. C. Camargo, SP.



**Figura 1** - Aspecto morfológico dos sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas avaliados no presente estudo. Coloração com hematoxilina e eosina (HE), objetiva de 40x. **(A)** Sarcoma pleomórfico composto predominantemente por células pleomórficas. **(B)** Sarcoma pleomórfico com áreas fusocelulares entremeadas por células pleomórficas. **(C)** Leiomiossarcoma exclusivamente fusocelular. Observa-se grande número de feixes de fibras musculares lisas dispostas em lençóis. **(D)** Leiomiossarcoma apresentando áreas fusocelulares e áreas pleomórficas entremeadas.

## 5.2 ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS GENÔMICAS EM SARCOMAS PLEOMÓRFICOS E LEIOMIOSSARCOMAS

A análise de alterações no número de cópias genômicas foi realizada em 37 amostras a fresco (20 casos de sarcomas pleomórficos indiferenciados e 17 casos de leiomiossarcomas) utilizando a metodologia de CGH-*array* em lâminas de 4x44K (Agilent Technologies). Os dados de cada caso foram adicionados ao software *Nexus version 6.0* (Biodiscovery) e avaliados quanto ao padrão de alterações cromossômicas envolvidas em ganhos e perdas genômicas de acordo com os critérios de qualidade de cada algoritmo aplicado (algoritmos *FASST Segmentation 2* e *STAC*; Material e Métodos).

### 5.2.1 Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados

A análise global das alterações observadas na análise de CGH-*array* para os 20 casos de SP revelou 2.003 alterações genômicas (média de 100,2; desvio-padrão de 94,5), sendo 858 ganhos (43%), 921 perdas (46%), 190 ganhos em alto nível (9%) e 34 perdas homozigotas (2%) (Figura 2A). Ganhos genômicos (ganhos e alto nível de ganhos) envolveram principalmente os cromossomos 1 e 7 (109 e 101 eventos, respectivamente), enquanto perdas cromossômicas (perdas heterozigotas e homozigotas) foram prevalentes nos cromossomos 3 e 16 (74 e 70 eventos, respectivamente) (Figura 2B).

A avaliação dos resultados quanto ao tamanho das alterações revelou ganhos genômicos envolvendo regiões de 82 a 138.889 Kb (média de 7.086 Kb e mediana de 3.047 Kb), enquanto as perdas variaram de 94 a 105.620 Kb (média de 10.321 Kb e

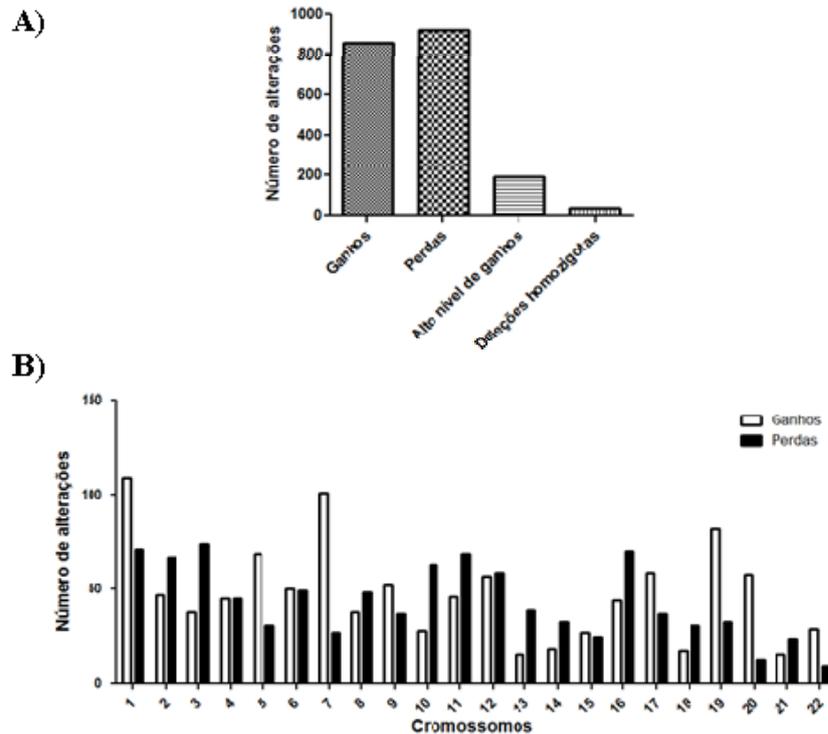
mediana de 3.882 Kb). Os dados de dispersão para o tamanho dos fragmentos associados com as alterações estão representados na Figura 3.

O perfil de alterações genômicas para cada caso, assim como, o ideograma representativo da análise global das alterações em cada cromossomo foram compilados nas Figuras 4 e 5, respectivamente. Em algumas regiões cromossômicas foram observadas alterações entre 10 e 100 Mb, incluindo o envolvimento de braços cromossômicos ou cromossomos inteiros. Essa característica foi marcante para perdas detectadas envolvendo 2q (87 Mb), 3p (30 Mb), 6q (70 Mb), 8p (33 Mb), 9p (40 Mb), 10q (70 Mb), 13q (74 Mb) e 16q (40 Mb), assim como, ganhos nas regiões cromossômicas 5p (45 Mb), 7p (38 Mb), 17p (22 Mb), 19p (20 Mb), 19q (24 Mb) e 20q (11 Mb).

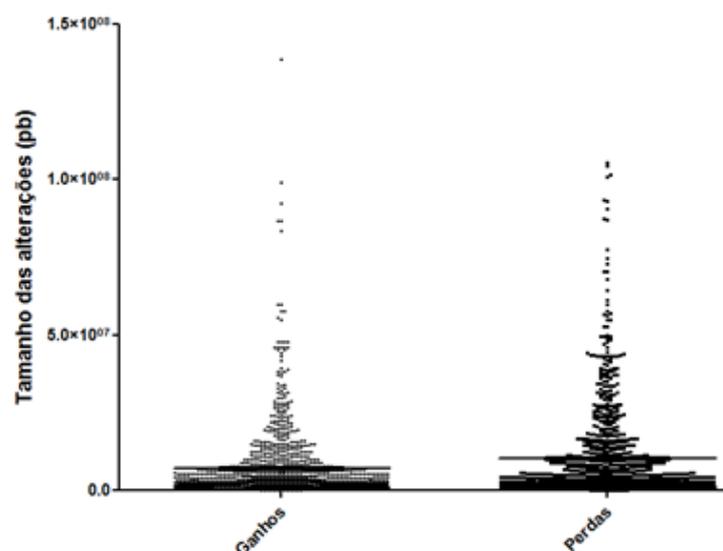
Foram identificadas regiões envolvidas em alto nível de ganhos em 85% (17/20) das amostras de SPI, com uma média de 11,2 alterações por caso. Estas alterações estavam presentes em no mínimo uma (SP5 e SP17) e no máximo 38 (SP2). Em adição, as regiões amplificadas estavam distribuídas por todos os cromossomos, sendo que o cromossomo 10 apresentou o menor número de alterações (uma alteração) e o cromossomo 7 o maior número (19 alterações). O tamanho das regiões amplificadas variaram de 0,1 a 59,8 Mb, das quais as maiores regiões afetaram 18q11.1-q23 (59,8 Mb), 7p22.3-7p11.1 (57,6 Mb), 5p15.33-p11 (46,1 Mb) e 6q21-q25.1 (45,9 Mb) (Anexos 1).

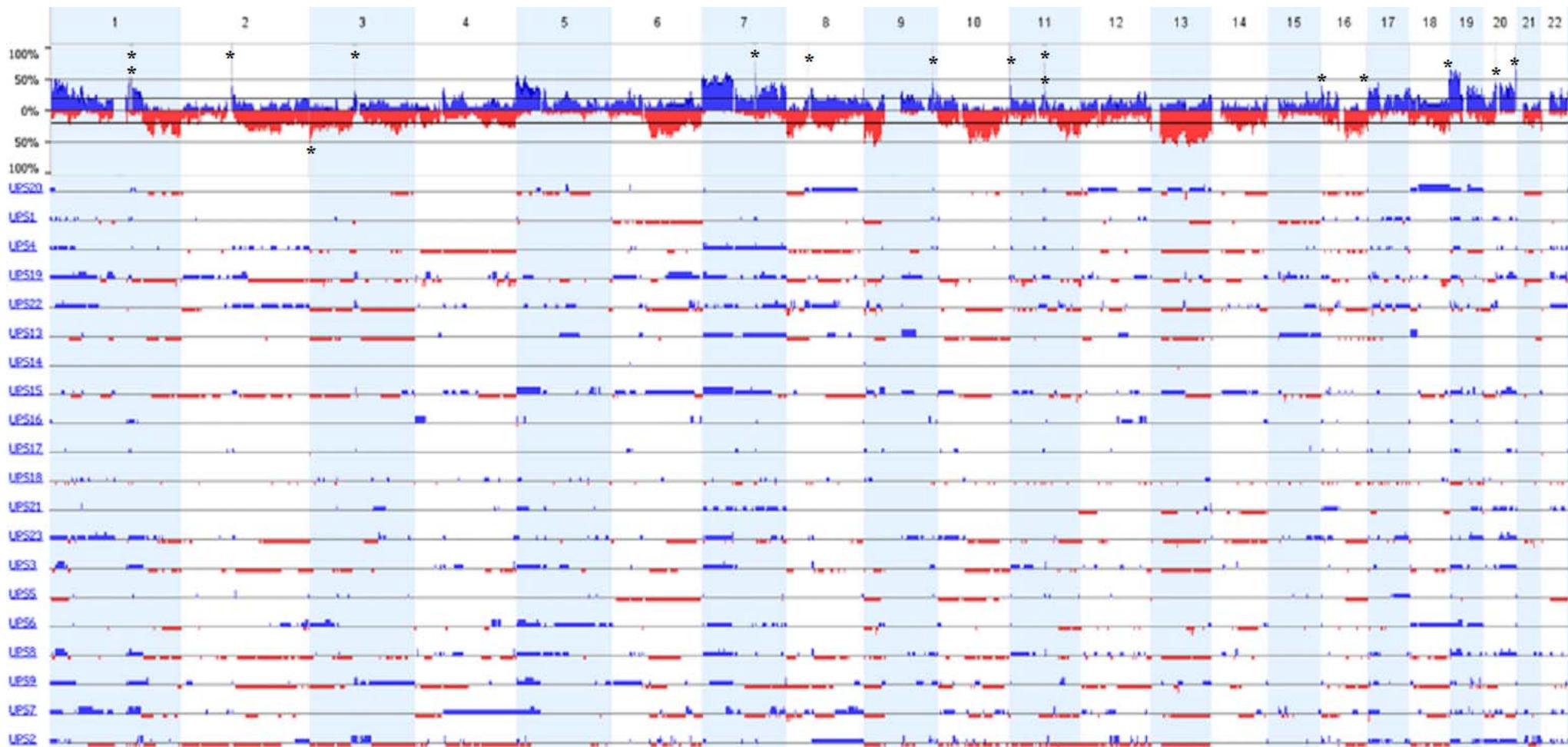
As alterações envolvendo perda de duas cópias (deleções homozigotas) foram observadas em menor frequência nas amostras de SPI. Foi verificada uma média de 2,3 perdas homozigotas por caso, com mínimo uma alteração em SP2, SP9 e SP20 e 17 alterações detectadas no caso SP19. Estas alterações abrangeram os cromossomos

1, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19 e 21, dos quais os cromossomos 4, 8 e 11 apresentaram cinco alterações envolvidas em perdas homozigotas e os cromossomos 1, 3, 10, 15, 17, 18 e 19 apresentaram apenas uma região alterada (Anexos 2). Exemplo do padrão de hibridação das amostras de SPI foi demonstrado na Figura 6A.

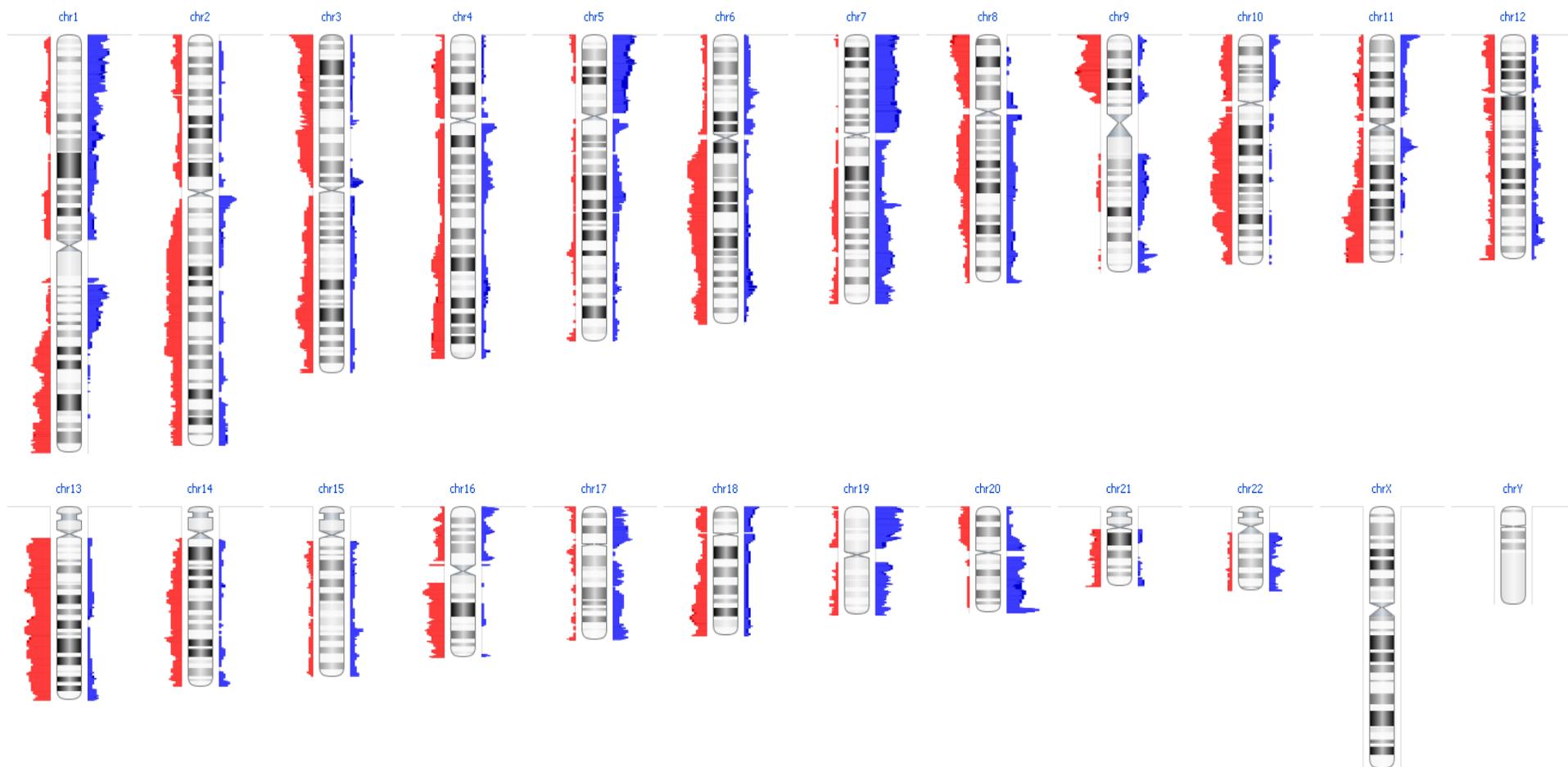


**Figura 2** - Representação gráfica do número de alterações em todo o genoma e por cromossomo encontrados nos 20 casos de SPI avaliados pela metodologia de CGH-array. (A) Observa-se um número semelhante de ganhos e perdas genômicas nas amostras de SPI. (B) Os ganhos (ganhos e alto nível de ganhos) foram prevalentes nos cromossomos 1 e 7, enquanto as perdas (perdas e perdas homocigotas) foram observadas em maior quantidade envolvendo os cromossomos 13 e 16. Imagens obtidas no programa *Graphpad Prism 5*.





**Figura 4** - Ideograma ilustrando as alterações genômicas encontradas nos 20 casos de SPI avaliados pela técnica de CGH-array. A representação das frequências de alterações em todo o conjunto cromossômico (chr1-22) também foi demonstrada no ideograma acima. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. As marcações (\*) indicam alterações significativas presentes em mais de 30% dos casos. Adaptação das imagens geradas pelo programa *Nexus version 6.0*.



**Figura 5** - Ideograma ilustrando a distribuição das alterações genômicas encontradas nos 20 casos de SPI avaliados pela técnica de CGH-*array* em todo o conjunto cromossômico (chr1-chr22). As barras à direita do eixo central de cada cromossomo representam ganhos (azuis), enquanto as barras à esquerda indicam perdas genômicas (vermelhas). Imagens geradas pelo programa *Nexus version 6.0*.

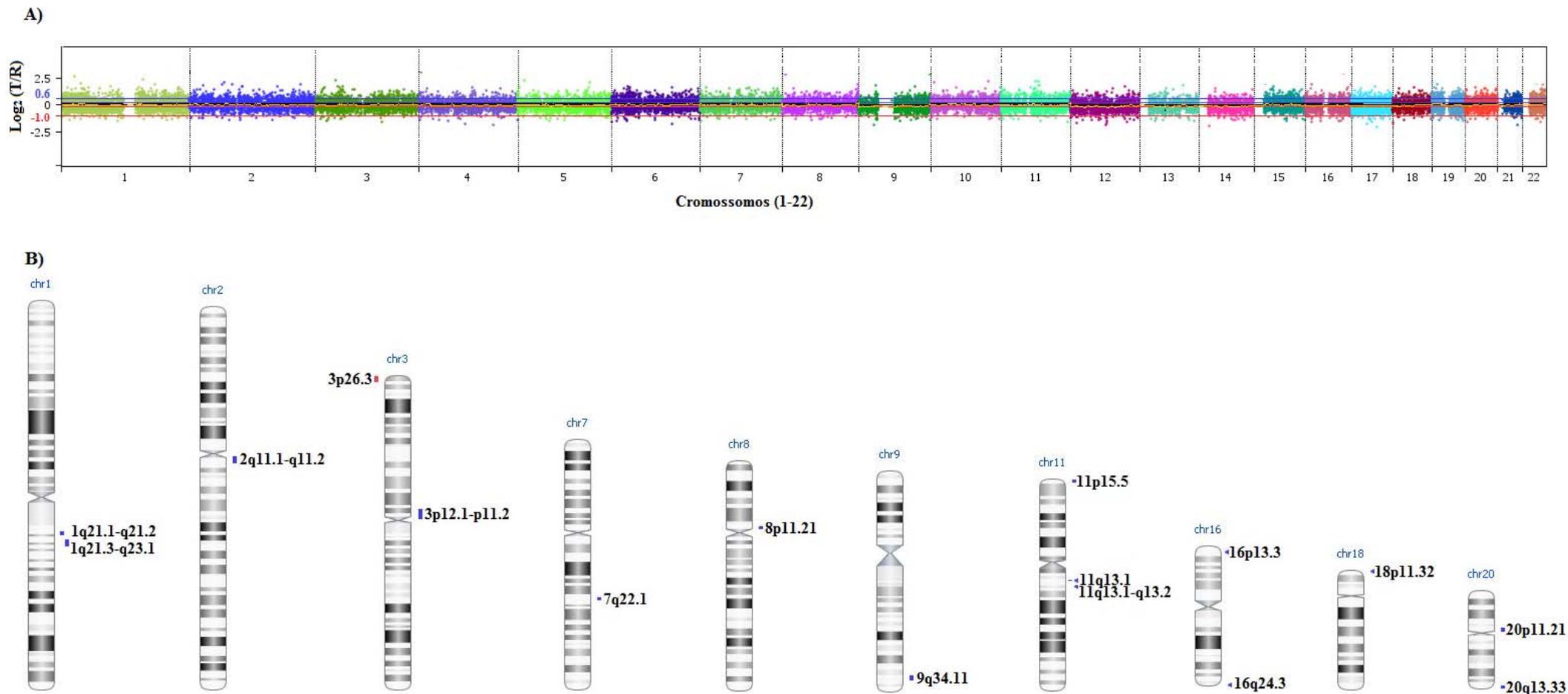
As alterações genômicas significativamente recorrentes nas amostras de SPI foram selecionadas utilizando o algoritmo *STAC* que permite a identificação das alterações no número de cópias mais frequentes no grupo amostral. Foram identificadas 16 regiões significativas presentes em mais de 20% das amostras de SPI (Figura 6B; Tabela 4).

As regiões cromossômicas alteradas detectadas em mais 50% dos casos envolveram ganhos em 20q13.33 (75%;  $P = 0,004$ ), 1q21.3-q23.1 (60%;  $P = 0,004$ ) e 7q22.1 (60%;  $P = 0,042$ ), assim como a perda em 3p26.3 (60%;  $P = 0,015$ ). Os ganhos em 9q34.11 ( $P = 0,008$ ) e 20p11.21 ( $P = 0,007$ ) foram identificados em 45% (9/20) dos casos, enquanto os ganhos envolvendo 1q21.1-q21.2 ( $P = 0,004$ ) e 16p13.3 ( $P = 0,036$ ) foram detectados em 40% (8/20) dos casos. Essas alterações variaram de 0.3 a 3,9 Mb e envolveram um total de 785 genes e 14 miRNAs. A porcentagem de cobertura de CNVs já descritas nas regiões alteradas variou de 12 a 100% e todas as CNVs encontradas foram classificadas como comuns (banco de dados DGV, do inglês *Database of Genomic Variants*). No entanto, todas as regiões alteradas significativamente recorrentes foram maiores que 100 Kb e, portanto, podem ter significado patológico.

Estas regiões alteradas abrangeram pequenas regiões cromossômicas ( $< 0,5$  Mb) em 16p13.3, 16q24.3 e 20p11.21 e amplas regiões cromossômicas ( $> 2$  Mb) em 1q21.3-q23.1, 2q11.1-q11.2 e 11p15.5. Em adição, foram detectadas regiões com alto nível de ganhos (ANG), incluindo 1q21.1-q21.2 (SP7), 1q21.3-q23.1 (SP7 e SP8), 3p12.1-p11.2 (SP2, SP9, SP15, SP19 e SP22), 7q22.1 (SP4), 8p11.21 (SP22), 11q13.1 (SP3 e SP8), 16p13.3 (SP2), 18p11.32 (SP13), 20p11.21 (SP19 e SP22). Não foi observada deleção homozigota nestas regiões.

Foi realizada uma associação entre as alterações genômicas presentes em mais de 20% dos casos ( $P < 0,05$ ) e dados clínicos e patológicos, incluindo gênero, localização do tumor (extremidade inferior, extremidade superior, retroperitônio, tronco ou cabeça e pescoço), presença de metástase à distância, presença de recorrência local, origem da amostra (tumor primário ou recidiva), grau histológico (G1, G2 ou G3), estadiamento clínico (TNM) e seguimento clínico (vivo sem a doença, vivo com a doença ou óbito pela doença).

Ganhos em 16q24.3 estavam significativamente presentes em tumores de pacientes que estão vivos sem a doença ( $P = 0,043$ ). Os ganhos em 18p11.32 não foram associados com as características clínicas, porém as perdas na mesma região foram significativamente associadas a pacientes que estão vivos com a doença ( $P = 0,016$ ).



**Figura 6** - (A) Representação gráfica do padrão de hibridação de uma amostra de SPI na plataforma de 4x 44 K, onde são representadas o padrão de distribuição das sondas em todo conjunto cromossômico (coloração específicas para as sondas em cada cromossomo). Os limites para ganhos (>0.2), perdas (-0.2), ganhos em alto nível (>0.6) e deleção homocigota (<-1.0) foram baseados no algoritmo de segmentação, permitindo a avaliação da razão logarítmica ( $\log_2$ ) da intensidade normalizada do número de cópias entre amostra alvo (tumoral) em relação à amostra referência (controle). (B) Representação esquemática das 16 alterações genômicas que foram significativamente frequentes em mais que 20% dos SPI avaliados (cromossomos 1, 2, 3, 7, 8, 9, 11, 16, 18 e 20). As barras à direita (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto barras à esquerda (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. Chr: cromossomo. Imagens geradas pelo software *Nexus version 6.0*.

**Tabela 4** - Regiões genômicas alteradas recorrentes entre os 20 casos de Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados ( $P < 0,05$ ).

Região cromossômica	Início (pb)	Término (pb)	Tamanho (Mb)	Evento	Genes	miRNAs	Frequência (%)	P-Valor	Casos alterados	CNV (%)
<b>1q21.1 - q21.2</b>	147.458.669	149.236.666	1.8	Ganho	64	0	40	0.004	SP23, SP16, SP17, SP19, SP1, SP3, SP7e SP8	49
<b>1q21.3 - q23.1</b>	151.345.357	155.272.136	3.9	Ganho	186	5	60	0.004	SP20, SP23, SP16, SP17, SP19, SP1, SP3, SP4, SP5, SP7, SP8 e SP9	27,6
<b>2q11.1 - q11.2</b>	95.562.577	98.202.102	2.6	Ganho	53	0	45	0.013	SP22, SP23, SP15, SP17, SP19, SP2, SP4, SP7 e SP9	56
<b>3p26.3</b>	0	726.469	0.7	Perda	4	0	60	0.015	SP22, SP23, SP13, SP15, SP17, SP19, SP2, SP3, SP4, SP6, SP8 e SP9	95,2
<b>3p12.1 - p11.2</b>	85.966.634	87.627.650	1.7	Ganho (amplificação)	7	0	30	0.009	SP22, SP15, SP17, SP19, SP2 e SP9	12,4
<b>7q22.1</b>	99.861.211	100.667.677	0.8	Ganho	61	0	60	0.042	SP21, SP22, SP13, SP15, SP16, SP17, SP19, SP1, SP2, SP4, SP6 e SP8	90,9
<b>8p11.21</b>	41.627.121	43.175.310	1.5	Ganho	25	1	40	0.032	SP20, SP22, SP23, SP13, SP18, SP19 e SP7	13,9
<b>9q34.11</b>	129.506.829	130.229.037	0.7	Ganho	49	2	45	0.008	SP20, SP23, SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP8 e SP9	19,6

<b>11p15.5</b>	0	2.197.662	2.2	Ganho	118	3	45	0.020	SP16, SP19, SP1, SP3 SP4, SP5, SP6, SP8 e SP9	80
<b>11q13.1</b>	65.171.847	66.296.450	1.1	Ganho	60	0	40	0.021	SP22, SP17, SP19, SP1, SP3, SP4, SP5 e SP8	24,5
<b>11q13.1 - q13.2</b>	66.882.158	67.549.110	0.7	Ganho	36	0	30	0.021	SP20, SP22, SP16, SP19, SP1 e SP4	91,5
<b>16p13.3</b>	1.062.920	1.341.725	0.3	Ganho	14	0	40	0.036	SP21, SP23, SP16, SP19, SP2, SP5, SP6 e SP9	100
<b>16q24.3</b>	87.762.155	88.283.196	0.5	Ganho	22	0	20	0.020	SP20, SP16, SP17 e SP1	63
<b>18p11.32</b>	0	846.102	0.8	Ganho	12	0	35	0.034	SP20, SP13, SP19, SP3, SP6, SP8 e SP9	45,4
<b>20p11.21</b>	22.798.105	23.302.271	0.5	Ganho	10	0	45	0.007	SP21, SP22, SP15, SP19, SP1, SP2, SP3, SP7 e SP8	30,5
<b>20q13.33</b>	60.236.430	61.684.607	1.4	Ganho	64	3	75	0.004	SP21, SP23, SP15, SP16, SP17, SP19, SP1, SP2, SP3, SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 e SP9	100

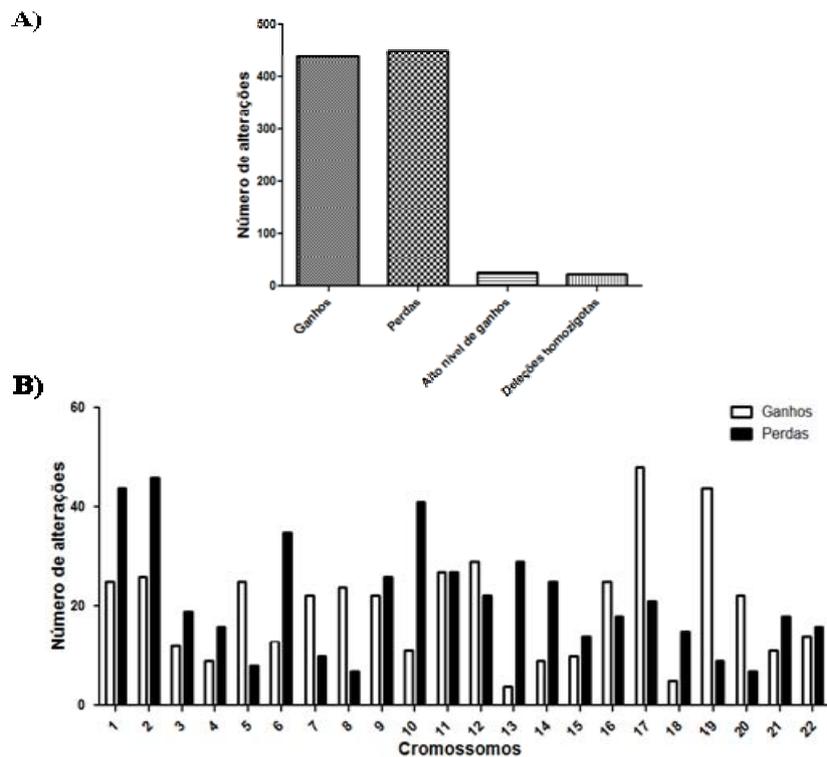
### 5.2.2 Leiomiossarcomas

Entre os 17 leiomiossarcomas avaliados neste estudo, foram observadas 910 alterações genômicas (média de 53,5; desvio-padrão de 43,1), sendo 411 ganhos (45,2%), 451 perdas (49,5%), 26 ganhos em alto nível (2,9%) e 22 perdas homozigotas (2,4%) (Figura 7A). Os tumores avaliados apresentaram alterações genômicas que variaram de sete a 143 alterações por caso (LMS9 e LMS8, respectivamente).

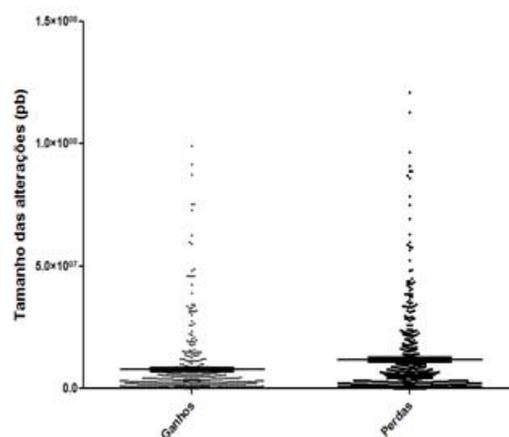
Ganhos e alto nível de ganhos envolveram principalmente os cromossomos 17 e 19 (48 e 44 eventos, respectivamente), enquanto perdas cromossômicas (perdas heterozigotas e homozigotas) foram prevalentes nos cromossomos 2 e 1 (46 e 44 eventos, respectivamente) (Figura 7B).

As regiões genômicas envolvidas em ganhos compreenderam regiões de 104 a 99.212 Kb (média de 7.879 Kb e mediana de 3.527 Kb), enquanto perdas variaram de 55 a 120.885 Kb (média de 11.852 Kb e mediana de 5.426 Kb). Os dados de dispersão para o tamanho dos fragmentos associados com as alterações genômicas estão representados na Figura 8.

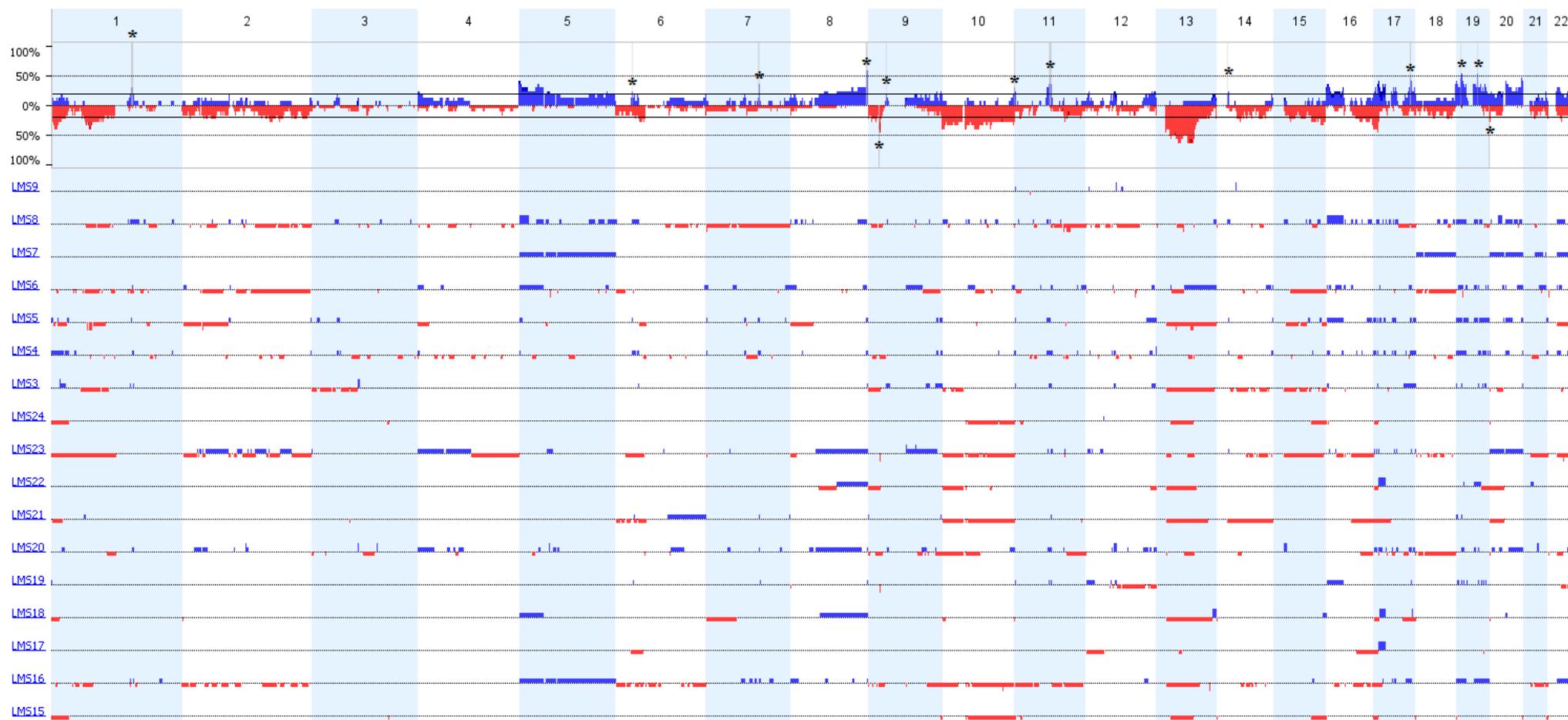
O perfil genômico de cada caso e a análise global das alterações genômicas em todo o conjunto cromossômico (cromossomos 1 ao 22) encontradas nos 17 casos de LMS avaliados pela técnica de CGH-*array* estão representados nas Figuras 9 e 10. Semelhante ao observado nos SPI, também foram observadas alterações genômicas envolvidas em perdas e ganhos maiores que 10 Mb nos LMS, incluindo perdas envolvendo os cromossomos 10, 13, 15 e 22, assim como, ganhos nos cromossomos 5, 8, 20 e 22. A Figura 11A representa um exemplo do padrão de hibridação observado nas amostras de LMS.



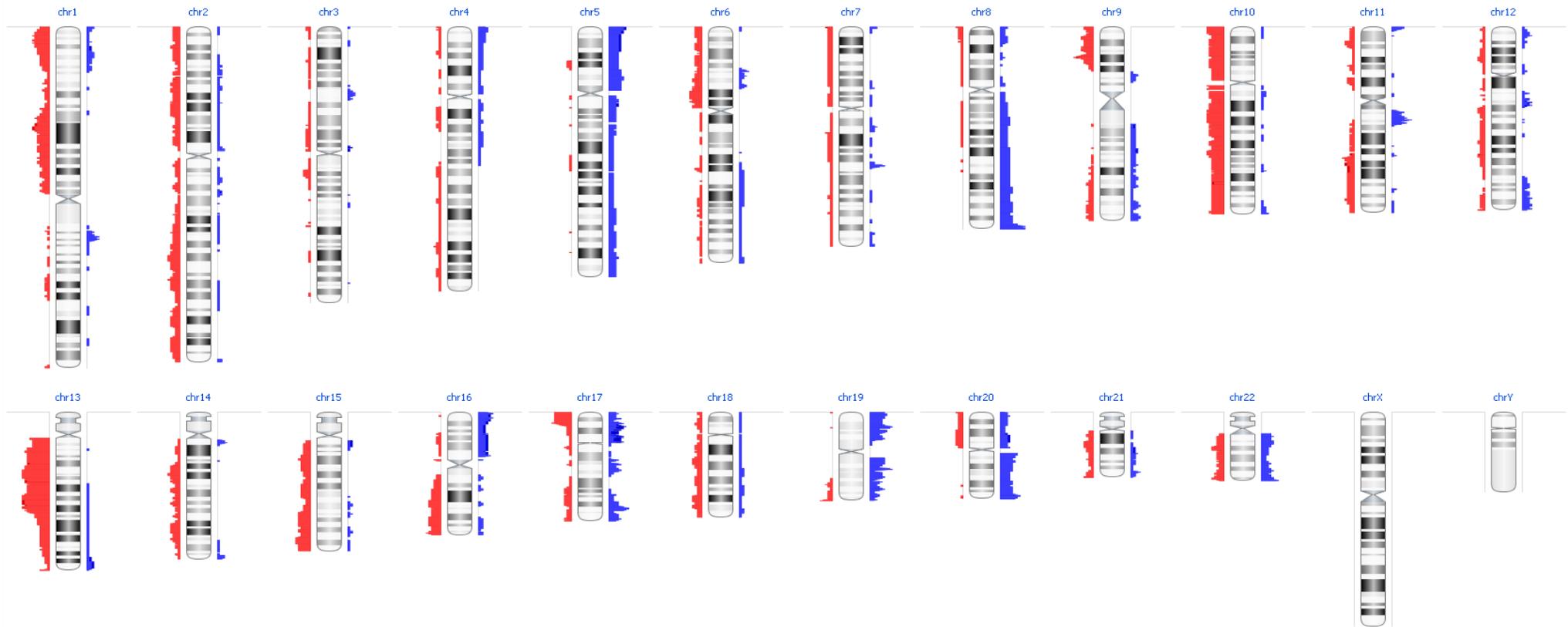
**Figura 7** - Representação gráfica do número de alterações em todo o genoma e por cromossomo encontrados nos 17 casos de LMS avaliados pela metodologia de CGH-array. (A) Observa-se um número semelhante de ganhos e perdas genômicas nas amostras de LMS. (B) Os ganhos (ganhos e alto nível de ganhos) foram prevalentes nos cromossomos 17 e 19, enquanto as perdas (perdas e perdas homocigotas) foram observadas em maior quantidade para os cromossomos 1 e 2. Imagens obtidas no programa *Graphpad Prism 5*.



**Figura 8** - Dados de dispersão baseados no tamanho das alterações genômicas (ganhos e perdas) encontradas para os 17 casos de LMS avaliados pela metodologia de CGH-array. Imagem obtida no programa *Graphpad Prism 5*.



**Figura 9** - Ideograma ilustrando as alterações genômicas encontradas nos 17 casos de LMS avaliados pela técnica de CGH-array. A representação das frequências de alterações em todo o conjunto cromossômico (chr1-22) também foi demonstrada no ideograma acima. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. As marcações (\*) indicam alterações significativas presentes em mais de 20% dos casos. Adaptação das imagens geradas pelo programa *Nexus version 6.0*.



**Figura 10** - Ideograma ilustrando a distribuição das alterações genômicas encontradas nos 17 casos de LMS avaliados pela técnica de CGH-array em todo o conjunto cromossômico (chr1-chr22). As barras à direita do eixo central de cada cromossomo representam ganhos (azuis), enquanto as barras à esquerda indicam perdas genômicas (vermelhas). Imagens geradas pelo programa *Nexus version 6.0*.

Em 64,7% dos LMS foram observadas 26 regiões envolvidas em alto nível de ganhos (LMS3, LMS4, LMS6, LMS7, LMS8, LMS9, LMS17, LMS18, LMS20, LMS22 e LMS23), sendo quatro casos com uma região (LMS4, LMS6, LMS7 e LMS17) e um caso com sete regiões amplificadas (LMS20). Os cromossomos 1, 2, 3, 5, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21 e 22 apresentaram alto nível de ganhos, sendo que a maior região envolvida foi verificada em 16p13.3-p11.2 (32 Mb) e a menor em 21p11.1 (105 Kb) (Anexo 3).

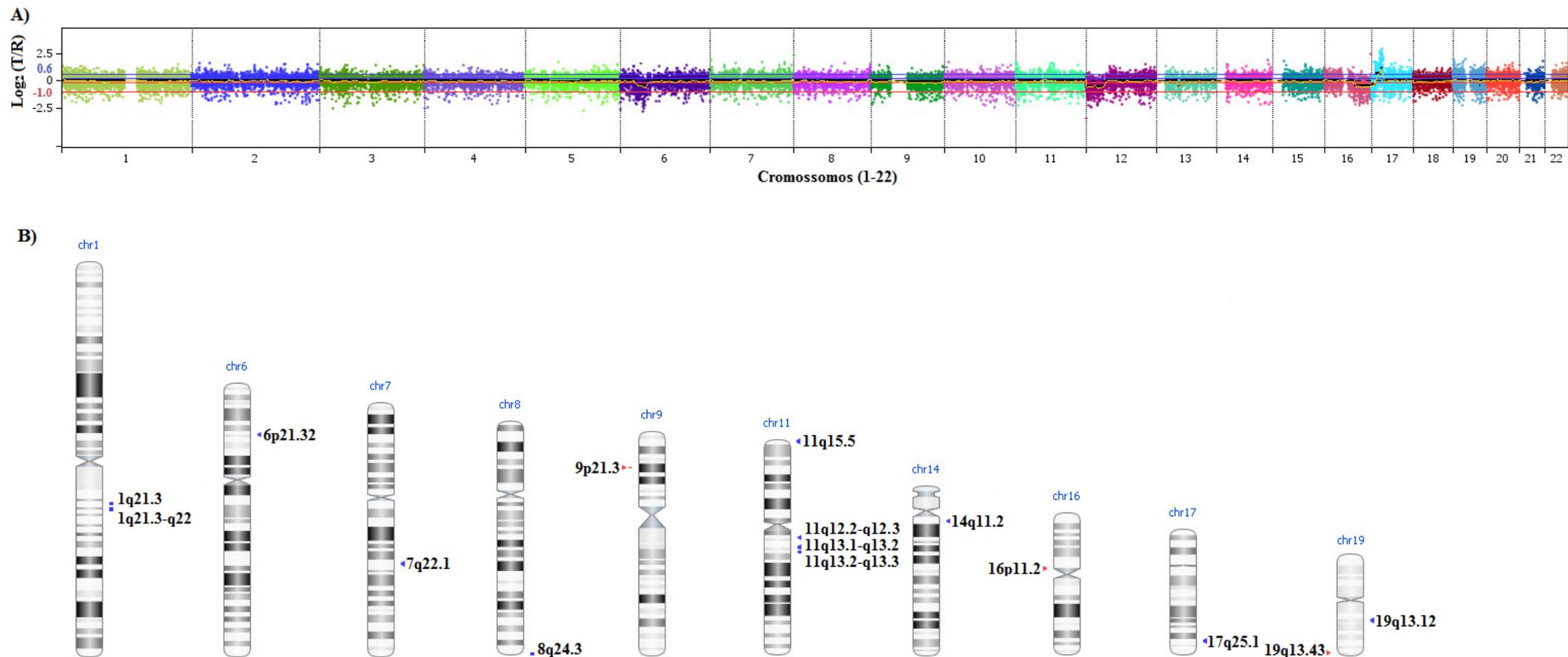
As regiões de perdas homozigotas foram detectadas em 59% dos casos (LMS3, LMS5, LMS6, LMS8, LMS16, LMS18, LMS19, LMS20, LMS22 e LMS23), sendo o mínimo de uma (LMS3, LMS18, LMS19, LMS20 e LMS22) e máximo de cinco (LMS5) alterações por caso. As perdas homozigotas abrangeram os cromossomos 1, 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 19, 21 e 22, sendo que o maior segmento alterado (7.6 Mb) foi observado em 11q22.1-q22.3 e o menor (55 Kb) em 22q13.1 (Anexo 4).

O algoritmo *STAC* também foi utilizado para a análise de regiões genômicas alteradas significativamente frequentes entre os casos LMS (Figura 11B; Tabela 5). Estas regiões foram comparadas com os dados clínicos, sendo observadas diferenças significativas com características de pior prognóstico, incluindo seguimento clínico e origem do tecido. Quinze alterações genômicas significativas foram identificadas em LMS, onde ganhos em 19q13.12 (52,9%), 8q24.3 (47,1%) e 17q25.1 (41,2%), assim como, a perda em 9p21.3 (41,2%) foram detectados em mais de 40% dos LMS. Em adição, perdas homozigotas envolvendo 9p21.3 foram observadas em dois casos (LMS19 e LMS23; Anexo 4).

As alterações genômicas detectadas variaram de 51 Kb a 2,75 Mb e envolveram 671 genes e 13 miRNAs. A porcentagem de cobertura de CNVs já descritas nas regiões alteradas variou de 0 a 100%. O ganho em 19q13.12 foi avaliado como uma CNV rara, ou seja, presente em  $< 1\%$  do banco de dados do DGV (banco de dados DGV, do inglês *Database of Genomic Variants*).

Os ganhos em 1q21.3, 11q12.2-q12.3 e 19q13.12 foram significativamente associados a pacientes que morreram pela doença ( $P = 0,001$ ,  $P = 0,003$  e  $P = 0,020$ , respectivamente), sendo que os ganhos em 1q21.3 foram também correlacionados com desenvolvimento de metástases à distância ( $P = 0,001$ ). Em adição, o ganho em 17q25.1 foi associado significativamente com recorrência local ( $P = 0,041$  e  $P = 0,044$ , respectivamente).

Também entre as regiões mínimas alteradas em LMS, duas regiões cromossômicas (16p11.2 e 19q13.43) foram identificadas com diferenças significativas nas proporções de casos com perdas e ganhos simultaneamente, onde cada evento (ganho ou perda) envolvendo estas regiões foram associados com características clínicas diferentes nestes tumores. A perda em 16q11.2 foi relacionada à recidiva local ( $P = 0,006$ ), enquanto os ganhos na mesma região foram significativamente associados à sobrevida reduzida ( $P = 0,027$ ). Embora, a perda em 19q13.43 tenha sido identificada em uma proporção mais elevada de LMS, nenhuma correspondência foi observada com características clínicas e patológicas. Em contraste, os ganhos observados na mesma região foram estatisticamente significativos com recorrência local e redução da sobrevida global nestes pacientes ( $P = 0,044$  e  $P = 0,016$ , respectivamente).



**Figura 11** - (A) Representação gráfica do padrão de hibridação de uma amostra de LMS na plataforma de 4x 44 K, onde são representadas o padrão de distribuição das sondas em todo conjunto cromossômico (coloração específicas para as sondas em cada cromossomo). Os limites para ganhos ( $>0.2$ ), perdas ( $-0.2$ ), ganhos em alto nível ( $>0.6$ ) e deleção homocigota ( $<-1.0$ ) foram baseados no algoritmo de segmentação, permitindo a avaliação da razão logarítmica ( $\log_2$ ) da intensidade normalizada do número de cópias entre amostra alvo (tumoral) em relação à amostra referência (controle). (B) Representação esquemática das 15 alterações genômicas que foram significativamente frequentes em mais que 20% dos LMS avaliados (cromossomos 1, 6, 7, 8, 9, 11, 14, 16, 17 e 19). As barras à direita (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto barras à esquerda (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. Chr: cromossomo. Imagens geradas pelo software *Nexus version 6.0*.

**Tabela 5** - Regiões genômicas alteradas recorrentes entre os 17 casos de leiomiossarcomas ( $P < 0,05$ ).

Região cromossômica	Início (pb)	Término (pb)	Tamanho (Mb)	Evento	Genes	miRNAs	Frequência (%)	P-Valor	Casos alterados	CNV (%)
1q21.3	151.256.551	151.856.750	0.6	Ganho	27	0	23.5	0.018	LMS5, LMS6, LMS8 e LMS20	17
1q21.3 - q22	152.467.522	154.387.590	1.9	Ganho	88	2	23.5	0.018	LMS4, LMS8, LMS16 e LMS20	48
6p21.32	31.923.769	32.132.073	0.2	Ganho	24	1	23.5	0.008	LMS4, LMS5, LMS8 e LMS19	75
7q22.1	99.647.068	100.857.537	1.2	Ganho	78	0	29.4	0.006	LMS4, LMS5, LMS16, LMS20 e LMS21	88
8q24.3	143.523.381	146.274.826	2.8	Ganho	127	4	47	0.045	LMS4, LMS5, LMS6, LMS8, LMS16, LMS18, LMS22 e LMS23	73
9p21.3	21.199.776	22.226.425	1	Perda	23	1	41.2	0.023	LMS3, LMS4, LMS8, LMS16, LMS19, LMS20 e LMS22	44
11p15.5	0	1.567.792	0.9	Ganho	87	1	23.5	0.011	LMS3, LMS4, LMS5, LMS9 e LMS19	91
11q12.2 - q12.3	61.352.779	62.229.449	0.9	Ganho	37	0	29.4	0.047	LMS4, LMS5, LMS8, LMS20 e LMS23	51
11q13.1 - q13.2	64.322.265	67.979.861	3.7	Ganho	181	3	29.4	0.047	LMS3, LMS4, LMS5, LMS19 e LMS20	51
11q13.2 - q13.3	68.744.800	70.077.870	1.3	Ganho	19	1	29.4	0.047	LMS3, LMS4, LMS6, LMS8, LMS20 e LMS21	27
14q11.2	21.580.291	22.230.297	0.7	Ganho	44	0	23.5	0.007	LMS4, LMS5, LMS8 e LMS23	84
16p11.2	34.059.589	34.361.998	0.3	Perda	1	0	23.5	0.031	LMS3, LMS16, LMS18 e LMS23	100

17q25.1	68.836.129	70.494.896	1.7	Ganho	40	0	41.2	0.05	LMS3, LMS4, LMS5, LMS6, LMS16, LMS19 e LMS20	65
19q13.12	40.964.925	41.016.382	0.1	Ganho	5	0	52.9	0.008	LMS3, LMS4, LMS5, LMS6, LMS8, LMS16, LMS19, LMS20 e LMS22	0
19q13.43	63.347.573	63.811.651	0.5	Perda	36	0	23.5	0.043	LMS8, LMS18, LMS20 e LMS22	59

### **5.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS ALTERAÇÕES GENÔMICAS PRESENTES NOS SARCOMAS PLEOMÓRFICOS INDIFERENCIADOS E LEIOMIOSARCOMAS**

Foi realizada a comparação do padrão de alterações genômicas encontrado entre os grupos de sarcomas pleomórficos indiferenciados (20 casos) e os leiomiossarcomas (17 casos). Embora não significativas, as amostras de LMS apresentaram menor número de ganhos e perdas genômicas quando comparados aos casos de SP (910 e 2.003 alterações, respectivamente; Figura 12) ( $P = 0,076$ ).

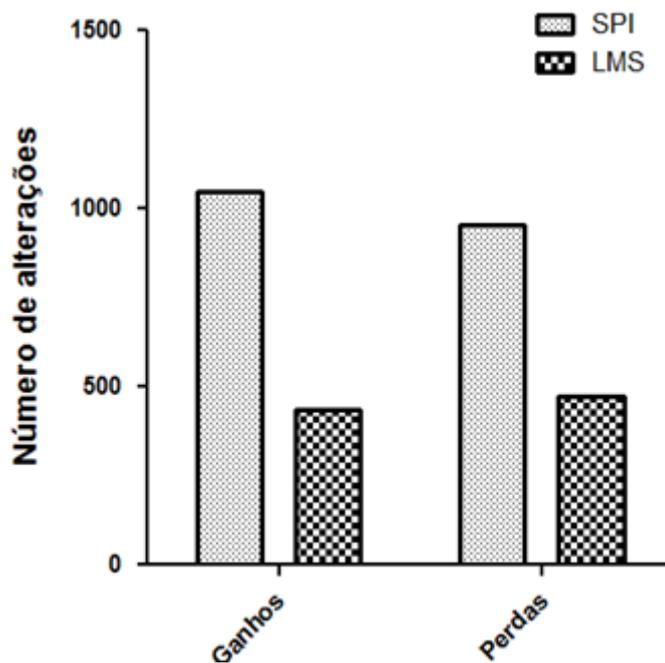
A busca por regiões com perdas ou ganhos genômicos capazes de distinguir os dois grupos avaliados resultou na detecção de alterações com diferença significativa entre as amostras de SPI e LMS ( $P < 0,05$ ; Figura 13). Foram identificadas 229 regiões cromossômicas (111 ganhos e 118 perdas) capazes de distinguir os dois grupos avaliados, incluindo ganhos envolvendo os cromossomos 1, 2, 7, 8 e 20 e perdas nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 13, 14 e 17. Do total de alterações observado na análise comparativa, 48% (110/229) foram compartilhadas pelos dois grupos tumorais, enquanto, 50,7% foram exclusivas para os SPI (116/229) e 1,3% (3/229) foram exclusivas para LMS (Anexo 5). Alterações genômicas envolvendo grandes regiões cromossômicas (cromossomos inteiros ou braços cromossômicos) foram compartilhadas nestes dois tumores, incluindo os ganhos nos cromossomos 19 e 20 e as perdas no cromossomo 13 e na região 10q.

Os ganhos envolvendo o braço curto do cromossomo 7, particularmente 7p22.1, 7p21.3, 7p21.1-p15.3, 7p15.3-p15.2, 7p15.2-p15.1, 7p13-p12.3 e 7p13-p12.3, estavam presentes em mais de 50% dos casos de SPI e ausente nos casos de

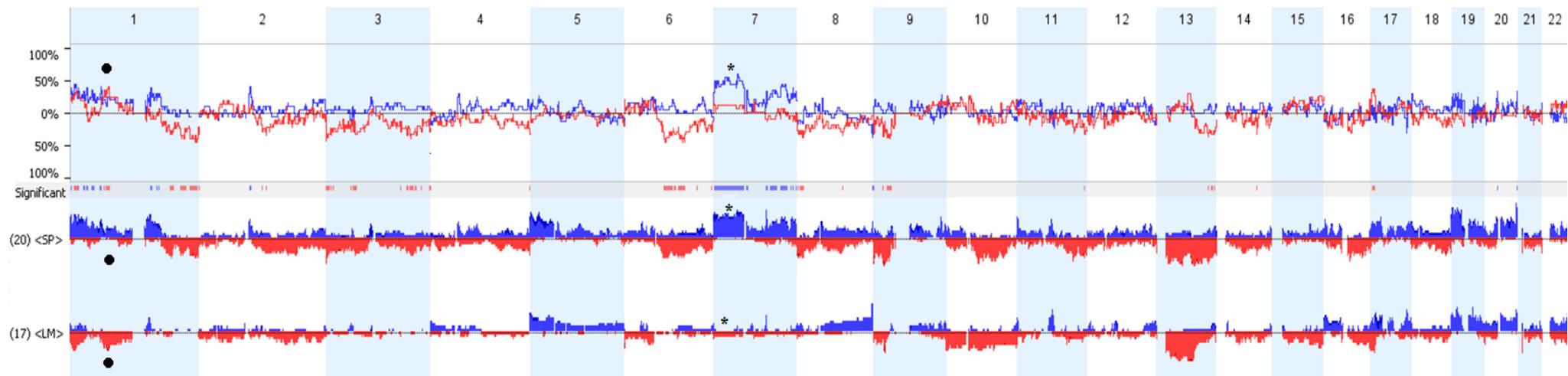
LMS. A descrição detalhada das alterações genômicas presentes nestas regiões está listada na Tabela 6. Embora, em menor número, também foram observadas três alterações específicas para o grupo dos LMS envolvendo perdas em 1p31.3 (35%) e 1p31.1 (41%).

Na comparação das regiões associadas a alto nível de ganho entre os dois grupos tumorais, 10/26 regiões foram específicas para o grupo dos LMS, incluindo 3q13.33, 5q11.2, 12q24.33, 14q13.2-q13.3, 20p12.1-p11.22, 21p11.1, 21q21.2-q21.3 e 22q13.33 (Anexo 3). As demais alterações (16 regiões) também estavam presentes nos SPI.

Na comparação das regiões de deleções homozigotas, apenas três regiões alteradas foram compartilhadas entre os dois grupos tumorais (9p21.3, 13q14.3 e 13q21.31-q21.33), sendo o restante específica para cada grupo (Anexos 2 e 4).



**Figura 12** - Representação gráfica do número total de alterações genômicas encontradas nas 20 amostras de sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI) e nas 17 amostras de leiomiossarcomas (LMS) avaliadas pela metodologia de CGH-array. Foi observado número maior de alterações genômicas nas amostras de SPI em relação as amostras de LMS . Imagens obtidas no programa *Graphpad Prism 5*.



**Figura 13** - Comparação do padrão geral de alterações em todo o conjunto cromossômico (ch1 - ch22) para os 37 casos de sarcomas. Alterações envolvendo ganhos nos cromossomos 1, 2, 7, 8 e 20 e perdas nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 13, 14 e 17 foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos. A maioria das alterações observadas na análise comparativa foi específicas para os casos SPI, incluindo os ganhos envolvendo 7p (\*). As perdas em 1p31.1 e 1p31.3 (•) foram específicas para o grupo dos LMS. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas para cada grupo de sarcomas. O gráfico superior representa as alterações estatisticamente diferentes entre os dois grupos (*significant*), sendo a linha vermelha (perdas) direcionadas abaixo de 0% para SPI e acima para LMS, e a linha azul (ganhos) direcionada acima de 0% para SPI e abaixo para LMS. Adaptação da imagem obtida no *software Nexus version 6.0*. SP: sarcomas pleomórficos indiferenciado, LM: leiomiossarcomas.

**Tabela 6** - Alterações genômicas exclusivas presentes em mais de 30% dos casos nos SPI ( $P < 0,05$ ) obtidas pela análise comparativa dos dois grupos.

Região	Início	Término	Evento	Genes	miRNAs	Tamanho (pb)	Frequência SPI (%)	Frequência (LMS) %	Diferença	P-Valor	CNV (%)
<b>Cromossomo 1</b>											
p34.2	41,351,795	41,551,926	Ganhos	2	0	200131	30	0	30	0.022	2.5
p34.2	41,551,926	42,203,467	Ganhos	4	0	651541	35	0	35	0.009	1.6
p34.2	42,203,467	42,434,184	Ganhos	5	0	230717	30	0	30	0.022	1.7
p34.2	42,533,020	42,579,359	Ganhos	1	0	46339	30	0	30	0.022	0.0
p34.2	43,081,662	43,169,835	Ganhos	4	0	88173	30	0	30	0.022	2.3
p34.2	43,169,835	43,495,362	Ganhos	7	0	325527	35	0	35	0.009	0.9
p34.1	45,738,575	45,842,892	Ganhos	4	0	104317	30	0	30	0.022	0.0
p34.1 - p33	45,938,326	46,665,318	Ganhos	17	0	726992	30	0	30	0.022	30.5
p32.2 - p32.1	57,694,851	58,710,284	Ganhos	5	0	1015433	30	0	30	0.022	2.7
p32.1	58,710,284	58,851,998	Ganhos	3	0	141714	35	0	35	0.009	0.4
p32.1	58,851,998	59,725,733	Ganhos	8	0	873735	40	0	40	0.004	19.9
p32.1	59,725,733	60,586,219	Ganhos	6	0	860486	35	0	35	0.009	8.5
q24.2	165,535,015	167,579,442	Ganhos	26	2	2044427	30	0	30	0.022	43.2
q24.3 - q25.1	169,183,353	171,925,386	Ganhos	36	3	2742033	30	0	30	0.022	35.7
q32.1	197,964,249	198,593,558	Perdas	6	0	629309	30	0	30	0.022	3.3
q32.3	210,621,517	211,243,725	Perdas	16	0	622208	30	0	30	0.022	51.7
q32.3 - q41	211,243,725	212,876,860	Perdas	12	0	1633135	35	0	35	0.009	2.7
q41	212,876,860	214,486,070	Perdas	5	0	1609210	40	0	40	0.004	3.6
q41	214,486,070	216,990,142	Perdas	6	0	2504072	35	0	35	0.009	12.0
q41	216,990,142	218,919,451	Perdas	20	3	1929309	40	0	40	0.004	2.0
q41	218,919,451	219,295,383	Perdas	5	0	375932	35	0	35	0.009	5.4
q41	219,295,383	219,802,749	Perdas	1	0	507366	30	0	30	0.022	0.6
q41 - q42.12	220,570,404	223,676,375	Perdas	40	1	3105971	30	0	30	0.022	40.0
q42.2	229,122,626	229,161,130	Perdas	2	0	38504	30	0	30	0.022	0.0
q42.2	229,161,130	229,194,462	Perdas	3	0	33332	35	0	35	0.009	0.0
q42.2 - q42.3	229,194,462	233,337,455	Perdas	42	1	4142993	40	0	40	0.004	41.9
q42.3 - q43	233,337,455	234,776,800	Perdas	23	1	1439345	35	0	35	0.009	40.9

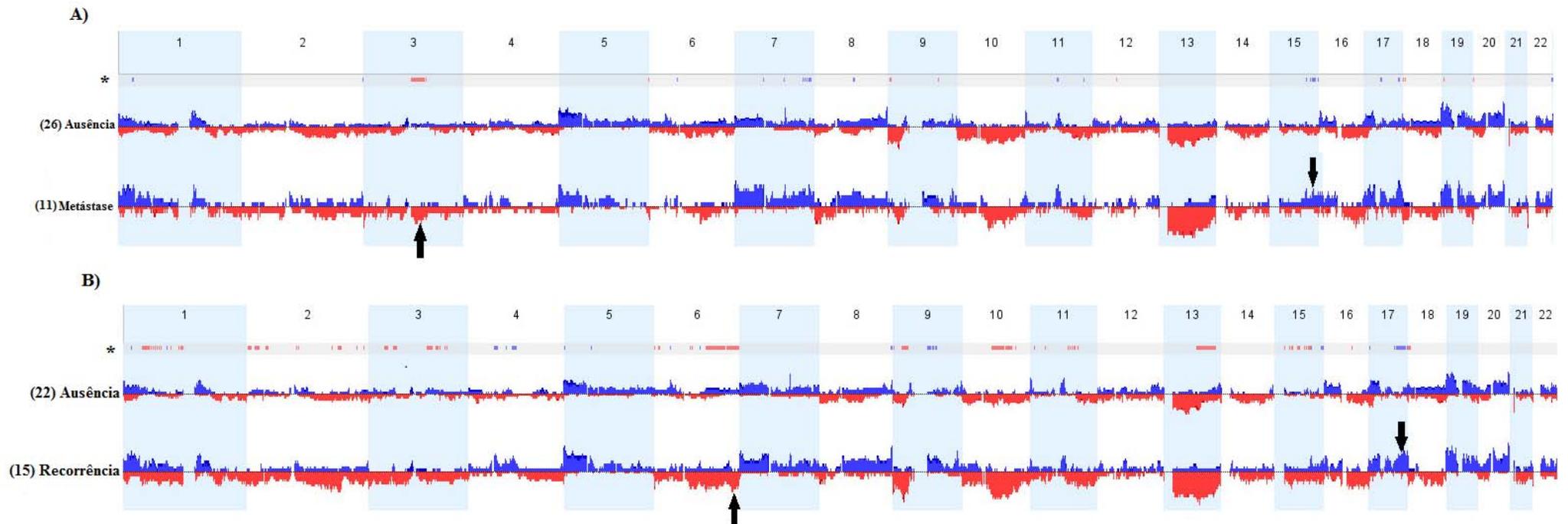
q43	234,776,800	239,736,121	Perdas	17	0	4959321	40	0	40	0.004	33.6
q43	239,736,121	239,759,320	Perdas	1	0	23199	45	0	45	0.002	0.0
q43	239,759,320	239,894,714	Perdas	4	0	135394	40	0	40	0.004	17.3
q43	239,894,714	241,411,205	Perdas	8	0	1516491	35	0	35	0.009	44.9
q43 - q44	241,411,205	242,105,905	Perdas	6	0	694700	40	0	40	0.004	24.5
q44	242,105,905	242,408,855	Perdas	4	0	302950	45	0	45	0.002	0.6
q44	242,408,855	244,884,837	Perdas	20	0	2475982	40	0	40	0.004	44.8
<b>Cromossomo 2</b>											
q11.2	96,929,125	97,777,483	Ganhos	15	0	848358	40	0	40	0.004	91.5
q11.2	97,777,483	98,202,102	Ganhos	4	0	424619	35	0	35	0.009	1.7
q11.2	98,202,102	99,449,598	Ganhos	21	0	1247496	30	0	30	0.022	28.9
q14.2	121,025,141	121,766,064	Perdas	5	0	740923	30	0	30	0.022	4.0
q14.3	127,467,910	127,534,593	Perdas	1	0	66683	35	0	35	0.009	32.2
<b>Cromossomo 3</b>											
p25.3	9,328,447	9,850,063	Perdas	27	0	521616	30	0	30	0.022	6.2
p25.3	9,850,063	10,185,858	Perdas	25	0	335795	35	0	35	0.009	8.4
p25.3	10,185,858	11,275,799	Perdas	17	1	1089941	30	0	30	0.022	5.4
p25.1 - p24.3	13,468,331	14,924,734	Perdas	22	0	1456403	30	0	30	0.022	36.1
p21.31	47,765,586	48,122,442	Perdas	7	1	356856	30	0	30	0.022	11.1
p21.31 - p21.2	50,638,063	51,501,847	Perdas	8	0	863784	30	0	30	0.022	25.1
p21.1	53,318,057	53,872,071	Perdas	6	0	554014	30	0	30	0.022	0.0
q23	143,175,282	143,554,594	Perdas	5	0	379312	30	0	30	0.022	90.4
q25.2	153,662,003	154,015,789	Perdas	1	0	353786	30	0	30	0.022	74.4
q25.2 - q25.31	154,015,789	157,031,277	Perdas	20	0	3015488	35	0	35	0.009	15.8
q25.31	157,031,277	157,090,862	Perdas	2	0	59585	30	0	30	0.022	0.0
q25.32 - q25.33	159,313,048	161,097,748	Perdas	14	0	1784700	30	0	30	0.022	7.0
q25.33 - q26.1	161,097,748	161,820,237	Perdas	18	2	722489	35	0	35	0.009	4.0
q26.1	161,820,237	162,012,616	Perdas	2	0	192379	40	0	40	0.004	17.0
q26.2	170,326,390	171,889,311	Perdas	23	0	1562921	30	0	30	0.022	18.3
q26.2 - q26.31	171,889,311	173,307,960	Perdas	14	1	1418649	35	0	35	0.009	0.4
q26.33 - q27.1	181,483,714	184,609,382	Perdas	23	0	3125668	30	0	30	0.022	7.4
q29	197,456,850	198,136,250	Perdas	20	0	679400	30	0	30	0.022	100.0

q29	198,981,971	199,501,827	Perdas	9	0	519856	30	0	30	0.022	89.4
<b>Cromossomo 6</b>											
q13 - q14.1	75,584,859	76,314,627	Perdas	6	0	729768	40	0	40	0.004	22.1
q14.1	76,314,627	79,671,820	Perdas	7	0	3357193	45	0	45	0.002	35.6
q14.3	85,157,478	86,384,667	Perdas	6	0	1227189	35	0	35	0.009	4.3
q14.3 - q15	86,384,667	88,324,031	Perdas	17	0	1939364	30	0	30	0.022	33.5
q15	88,324,031	90,140,299	Perdas	19	0	1816268	35	0	35	0.009	18.6
q15	90,140,299	90,893,597	Perdas	8	0	753298	30	0	30	0.022	6.2
q15	90,893,597	91,305,081	Perdas	4	0	411484	35	0	35	0.009	1.2
q15 - q16.1	91,305,081	92,922,524	Perdas	3	0	1617443	30	0	30	0.022	39.3
q21	105,307,430	105,376,848	Perdas	1	0	69418	40	0	40	0.004	100.0
q21	105,376,848	106,787,108	Perdas	11	0	1410260	35	0	35	0.009	33.4
q21	106,787,108	107,190,817	Perdas	5	0	403709	40	0	40	0.004	11.7
q21	107,190,817	109,572,068	Perdas	29	1	2381251	35	0	35	0.009	21.1
q21	109,572,068	109,748,941	Perdas	5	0	176873	40	0	40	0.004	4.3
q21	109,748,941	111,112,032	Perdas	21	0	1363091	45	0	45	0.002	22.1
q21	111,862,918	113,880,418	Perdas	14	0	2017500	40	0	40	0.004	17.5
q21 - q22.1	113,880,418	114,486,979	Perdas	8	0	606561	45	0	45	0.002	15.1
q23.3 - q24.1	138,520,382	139,694,708	Perdas	21	0	1174326	30	0	30	0.022	29.6
q27	166,057,078	167,660,747	Perdas	24	1	1603669	30	0	30	0.022	36.8
<b>Cromossomo 7</b>											
p22.1	4,852,432	4,978,189	Ganhos	6	0	125757	50	0	50	0.001	91.1
p22.1 - p21.3	4,978,189	7,790,136	Ganhos	57	1	2811947	45	0	45	0.002	88.2
p21.3	7,790,136	8,220,924	Ganhos	4	0	430788	50	0	50	0.001	86.5
p21.3	8,220,924	9,060,255	Ganhos	4	0	839331	45	0	45	0.002	21.2
p21.3	9,060,255	12,347,493	Ganhos	9	0	3287238	40	0	40	0.004	33.6
p21.3 - p21.1	12,347,493	17,326,246	Ganhos	28	0	4978753	45	0	45	0.002	55.9
p21.1 - p15.3	17,326,246	19,737,692	Ganhos	14	1	2411446	50	0	50	0.001	54.0
p15.3	19,737,692	20,386,954	Ganhos	3	0	649262	45	0	45	0.002	7.4
p15.3	20,386,954	21,185,472	Ganhos	4	0	798518	50	0	50	0.001	7.4
p15.3	21,185,472	24,606,960	Ganhos	32	1	3421488	55	0	55	0.000	28.0
p15.3 - p15.2	24,606,960	27,141,203	Ganhos	28	1	2534243	50	0	50	0.001	7.7

p15.2	27,141,203	27,895,524	Ganhos	24	1	754321	55	0	55	0.000	35.2
p15.2 - p15.1	27,895,524	29,711,868	Ganhos	24	0	1816344	50	0	50	0.001	21.4
p15.1 - p14.1	29,711,868	38,886,485	Ganhos	121	4	9174617	45	0	45	0.002	26.4
p13	44,985,826	46,441,258	Ganhos	21	0	1455432	60	0	60	0.000	26.0
p13 - p12.3	46,441,258	49,191,724	Ganhos	16	0	2750466	55	0	55	0.000	19.0
q11.21	62,153,588	63,633,658	Ganhos	16	0	1480070	35	0	35	0.009	73.8
q11.21	63,633,658	64,926,018	Ganhos	28	0	1292360	30	0	30	0.022	100.0
q31.1	107,998,952	111,040,235	Ganhos	6	0	3041283	30	0	30	0.022	45.7
q31.1	111,740,442	112,221,908	Ganhos	4	0	481466	30	0	30	0.022	100.0
q31.1 - q31.2	112,221,908	116,191,043	Ganhos	25	0	3969135	35	0	35	0.009	23.0
q31.2	116,191,043	117,037,157	Ganhos	17	0	846114	30	0	30	0.022	2.2
q31.2 - q31.31	117,037,157	118,010,945	Ganhos	5	0	973788	35	0	35	0.009	14.5
q32.1	127,035,525	127,181,618	Ganhos	2	0	146093	30	0	30	0.022	0.0
q32.1	127,181,618	128,040,665	Ganhos	19	2	859047	35	0	35	0.009	36.6
q32.1 - q32.2	128,040,665	129,792,586	Ganhos	46	3	1751921	40	0	40	0.004	25.6
q32.2 - q32.3	129,792,586	131,124,061	Ganhos	25	3	1331475	45	0	45	0.002	25.9
q32.3 - q33	131,124,061	135,644,386	Ganhos	39	0	4520325	40	0	40	0.004	18.7
q33	135,644,386	135,819,661	Ganhos	0	0	175275	45	0	45	0.002	2.7
q33	135,819,661	136,473,621	Ganhos	3	1	653960	40	0	40	0.004	0.2
q33 - q34	136,473,621	137,354,848	Ganhos	7	0	881227	45	0	45	0.002	93.6
q34	137,354,848	138,569,463	Ganhos	14	0	1214615	35	0	35	0.009	66.9
q34	138,569,463	138,645,767	Ganhos	1	0	76304	30	0	30	0.022	11.0
q34	138,836,331	139,228,650	Ganhos	3	0	392319	30	0	30	0.022	1.4
q36.1	147,525,862	148,296,544	Ganhos	8	1	770682	30	0	30	0.022	11.4
<b>Cromossomo 8</b>											
q21.2 - q21.3	87,140,925	87,366,178	Perdas	3	0	225253	35	0	35	0.009	26.3
q21.3	87,366,178	88,953,683	Perdas	9	0	1587505	30	0	30	0.022	84.4
<b>Cromossomo 9</b>											
p21.1	32,108,149	32,430,740	Perdas	2	0	322591	40	0	40	0.004	6.6
p21.1 - p13.3	32,430,740	33,026,792	Perdas	13	0	596052	35	0	35	0.009	25.4
p13.3	33,026,792	33,051,222	Perdas	2	0	24430	30	0	30	0.022	1.3

## **5.4 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES GENÔMICAS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PIOR PROGNÓSTICO**

Com o intuito de identificar perfis genômicos de pior prognóstico, foram realizadas análises comparativas entre as alterações genômicas e as características clínicas dos pacientes avaliados neste estudo (SPI e LMS), incluindo metástases à distância (MD) e recorrência local (RL). A comparação entre dois grupos foi realizada considerando a presença e ausência da característica especificada. As regiões diferenciais entre os grupos podem ser observadas na Figura 14. Para o grupo de pacientes que desenvolveram MD foram identificados ganhos em 15q26.1 e perdas em 3q13.31 exclusivas em 47% dos pacientes MD (Figura 14A). Mais de 47% dos casos de pacientes RL apresentaram alterações exclusivas envolvidas em perdas de 6q25.2-q25.3 e 6q26-q27 e ganhos de 17q24.1, 17q24.2-q24.3 e 17q25.1 (Figura 14B).



**Figura 14** - Comparação do perfil genômico de acordo com as características clínicas como metástase à distância (A) e recorrência local (B) para todo o conjunto cromossômico. Estão destacadas as regiões significativamente diferenciais (\*), alterações frequentes em exclusivas (setas pretas) em casos que apresentaram metástase a distância (perdas em 3q13.31 e ganhos em 15q26.1) e recorrência local (perdas de 6q25.2-q25.3 e 6q26-q27 e ganhos de 17q24.1, 17q24.2-q24.3 e 17q25.1). As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. Imagens geradas pelo software *Nexus version 6.0*.

Duas regiões genômicas alteradas foram identificadas na comparação entre as duas características clínicas (Quadro 4), incluindo perdas em 3q13.31 e ganhos em 15q26.2. As alterações presentes em cada grupo de pacientes foram detalhadas nos Anexos 6 a 7.

**Quadro 4** - Alterações genômicas presentes em pacientes que desenvolveram metástase à distância ou recorrência local.

Região cromossômica	Metástase a distância	Recorrência Local
3q13.31		
15q26.2		

 Perdas
 Ganhos

## 5.5 ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS BASEADA NO PADRÃO DE ALTERAÇÕES GENÔMICAS

Com o objetivo de verificar se há um perfil genômico específico capaz de distinguir os LMS dos SPI ou se existem subgrupos tumorais com perfis genômicos associados a características clínico-patológicas semelhantes, foi realizada a análise de agrupamento hierárquico não supervisionado. Esta análise permitiu a classificação das amostras com perfil de alterações similares utilizando algoritmos específicos (*Complete Linkage Hierarchical Clustering Algorithm*).

A análise de agrupamento hierárquico não foi capaz de diferenciar os dois tipos tumorais, embora, alterações exclusivas a cada grupo tenham sido identificadas. Nesta análise também não foi possível observar o agrupamentos dos casos referentes aos sítios anatômicos. Foram detectados três grupos tumorais distintos denominados *Cluster 1* (10 casos), *Cluster 2* (16 casos) e *Cluster 3* (11 casos). O *cluster 1* foi composto por quatro amostras de SPI e sete LMS. O *cluster 2* apresentava dez SPI e seis LMS e o *cluster 3* apresentava seis SPI e quatro LMS (Figura 15A).

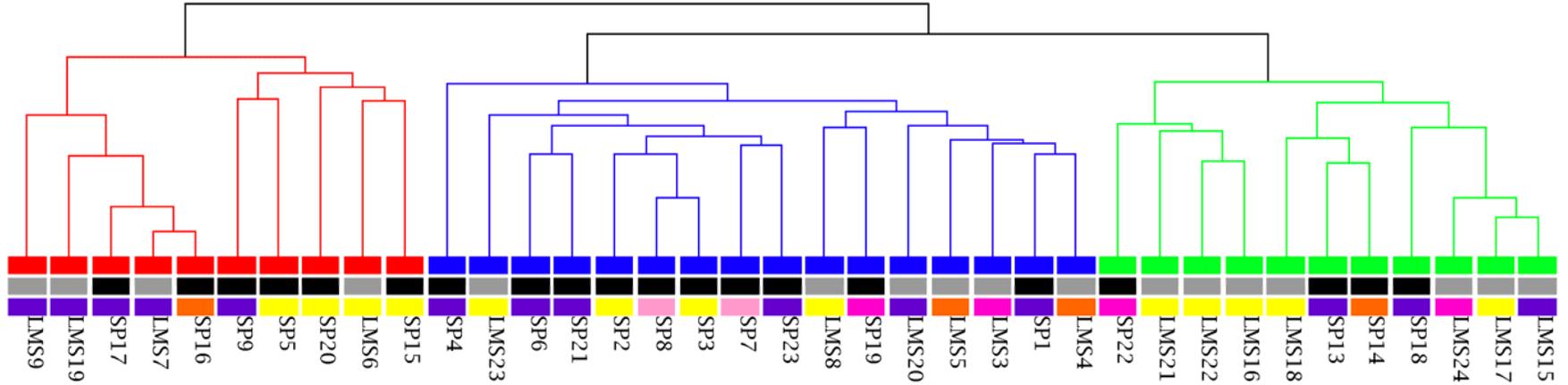
A comparação entre os *clusters 1, 2 e 3* mostrou diversas regiões cromossômicas com padrão de alterações distintos (Figura 15 B). Foi observado um padrão semelhante de alterações genômicas nas amostras presentes no *Cluster 1* e *3*, enquanto, o *Cluster 2* apresentou um perfil mais complexo de alterações genômicas. A comparação do *cluster 1 e cluster 2* revelou ganhos significativos em 1p, 1q, 9q, 16p, 19p e 20q e perdas em 17p e 18q (Figura 16A), as quais estavam frequentes no *cluster 2* e praticamente ausentes no *cluster 1*. A comparação entre *cluster 2* e o *cluster 3* revelou perdas em 13q e ganhos em 11q, 17p e 20q com alta frequência no

*cluster 2* quando comparado ao *cluster 3* (Figura 16B), enquanto a análise *cluster 1* com o *cluster 3* demonstrou ganhos específicos em 16p e 20q para o *cluster 3* e perdas em 13q e 17p prevalentes para o *cluster 1* (Figura 16C). As regiões cromossômicas significativamente diferentes na comparação dos três *clusters* foram compiladas nos Anexos 9 a 11.

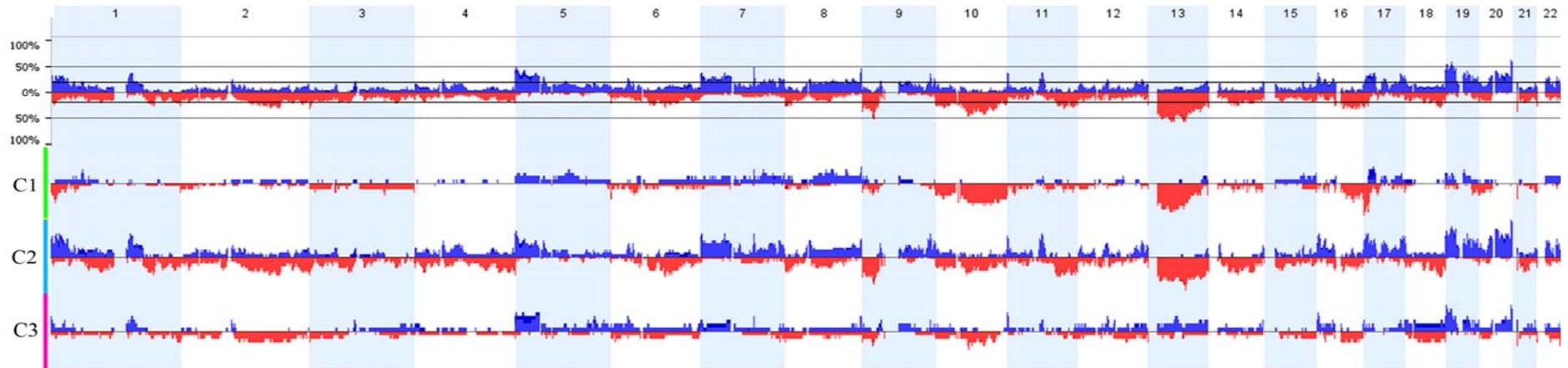
A comparação das alterações presentes nos três *clusters* com os dados clínicos e patológicos de cada paciente revelou uma associação significativa entre os tumores presentes no *cluster 2* e gênero feminino ( $P = 0,020$ ), assim como, casos de pacientes que morreram em decorrência da doença ( $P = 0,022$ ). O *cluster 3* foi principalmente composto por pacientes do gênero masculino ( $P = 0,023$ ). Nenhuma associação significativa entre as alterações genômicas e os parâmetros clínicos foi demonstrada para o *cluster 1*.

A maioria dos casos de pior prognóstico estavam localizados no *cluster 2*, incluindo 55% (3/6 SPI e 3/5 LMS) dos casos que desenvolveram metástase a distância e 70% (5/8 SPI e 4/5 LMS) dos casos que morreram em decorrência da doença. Na comparação com os demais *clusters*, 105 alterações foram exclusivas para o *cluster 2* (mais de 50% dos casos), sendo os ganhos em 1q21.2, 1q21.3, 9q34.11, 11p15.5, 11q13.1, 16p13.3 e 20q13.33 descritos previamente neste estudo como alterações significativas em SPI e LMS (Quadro 5).

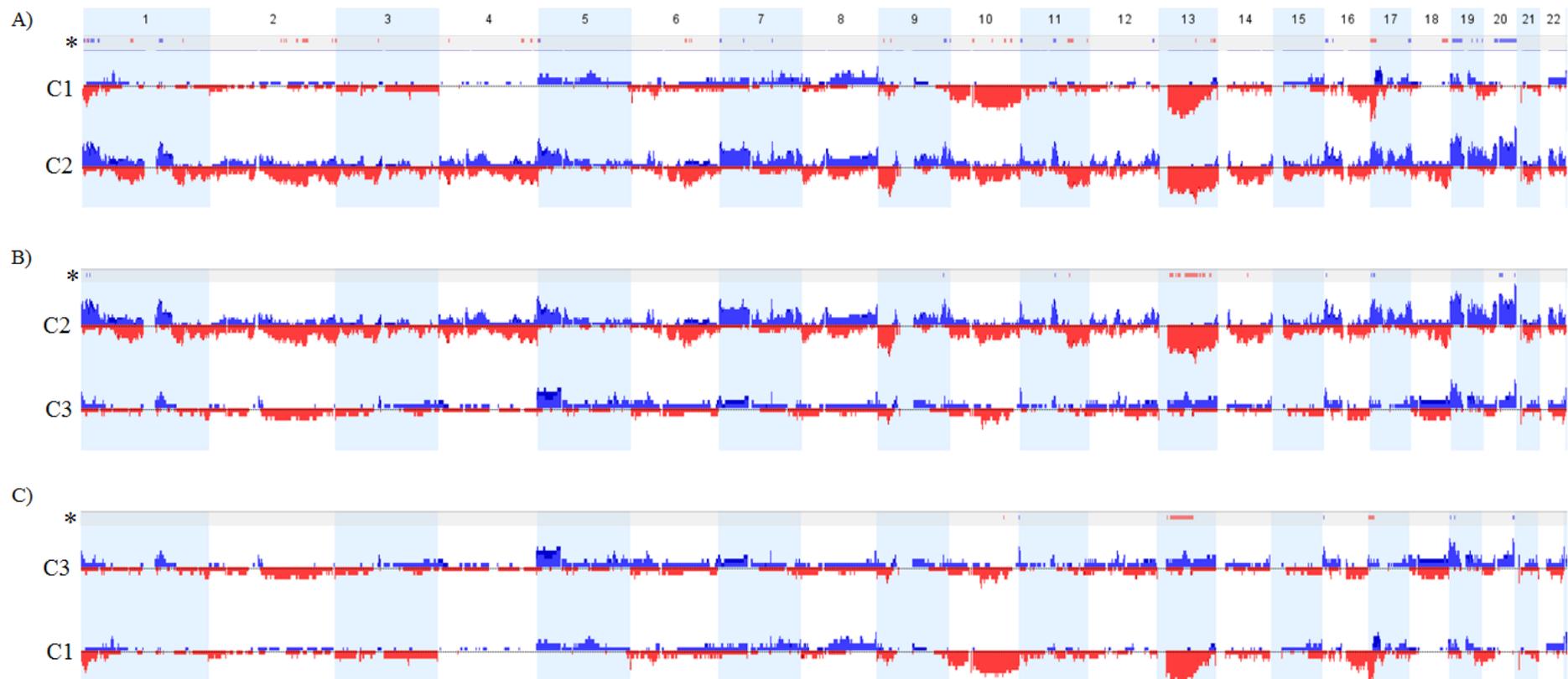
A)



B)



**Figura 15** - Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado realizada nas 20 SPI (preto) e 17 LMS (cinza) baseada no perfil de alterações genômicas encontrado em cada caso. (A) A análise dividiu os casos em três grupos denominados *Cluster 1* (11 casos), *Cluster 2* (16 casos) e *Cluster 3* (10 casos) representados pelas cores verde, azul e vermelho, respectivamente. No entanto, não foi possível observar o agrupamentos dos casos referentes aos sítios anatômicos como extremidade superior (pink), extremidade inferior (roxo), tronco (laranja), retroperitôneo (amarelo) e cabeça e pescoço (rosa). A (B) Representação gráfica do padrão de alterações genômicas para *cluster 1*, *cluster 2* e *cluster 3*. As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. Adaptação de imagem obtida no software *Nexus version 6.0*.



**Figura 16** - Representação gráfica da comparação do padrão de alterações genômicas para *cluster 1* (11 casos), *cluster 2* (16 casos) e *cluster 3* (10 casos). Foi realizada a comparação *cluster 1x2* (A), *cluster 2x3* (B) e *cluster 1x3* (C). As barras superiores (azuis) indicam ganhos genômicos, enquanto as barras inferiores (vermelhas) referem-se a perdas cromossômicas. As alterações encontradas significativamente na comparação serial entre os *clusters* foram compiladas na barra superior (\*). Adaptação das imagens obtidas no *software Nexus 6.0*.

**Quadro 5 - Alterações envolvidas em ganhos exclusivas para o *cluster 2* observadas previamente em SPI e LMS.**

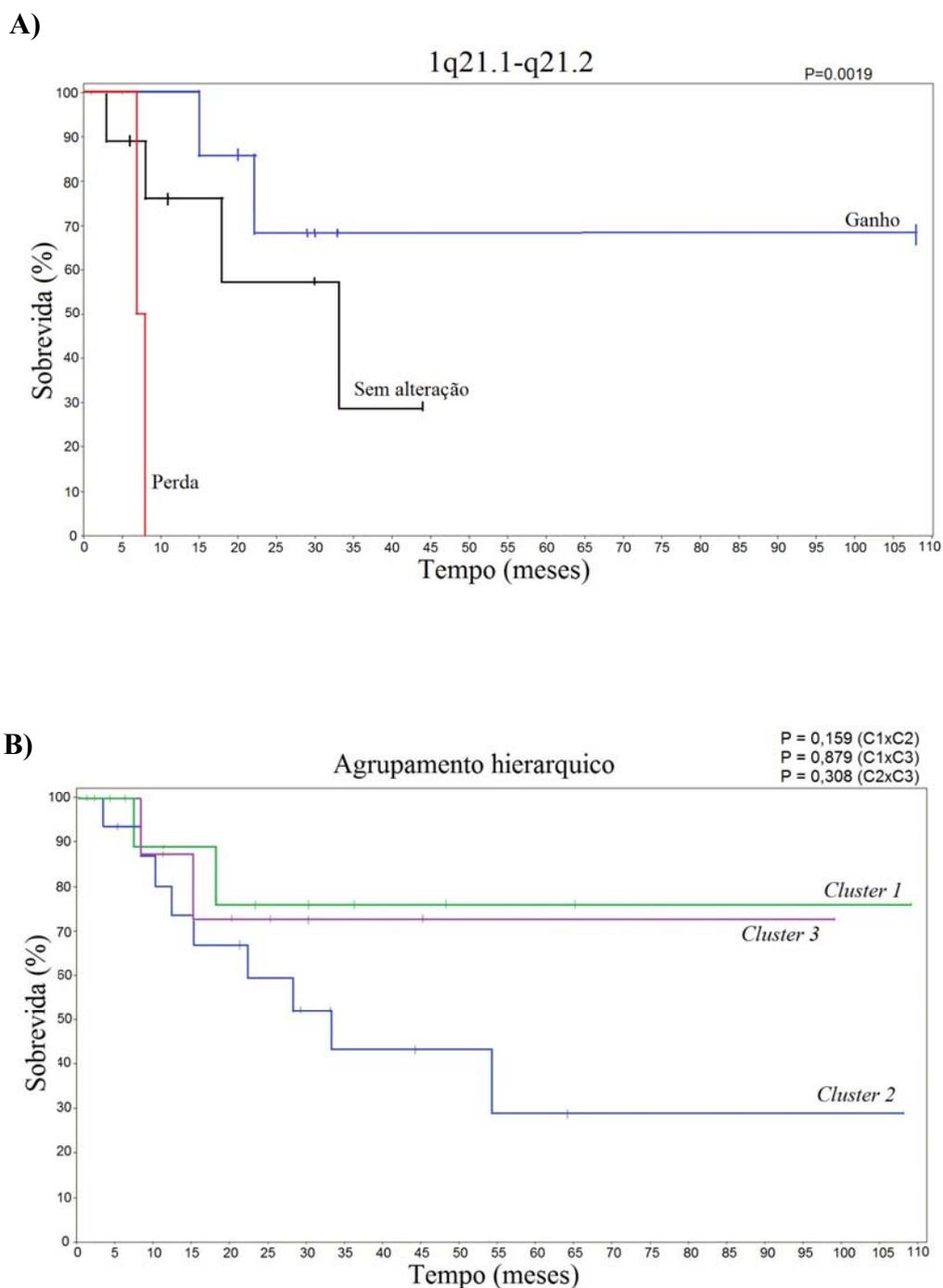
Região cromossômica	Início	Término	Tipo tumoral	Evento	Frequência Cluster 1 (%)	Frequência Cluster 2 (%)	P- Valor
1q21.2	148,838,061	149,236,666		Ganho	0	50.0	0.008
1q21.3	151,256,551	151,345,357		Ganho	0	50.0	0.008
1q21.3	151,345,357	151,440,060		Ganho	0	56.25	0.003
1q21.3	151,440,060	151,856,750		Ganho	0	62.5	0.001
9q33.3-q34.11	129,284,384	130,004,976		Ganho	0	62.5	0.001
9q34.11	130,004,976	130,655,259		Ganho	0	56.25	0.003
11p15.5	0	1,177,920		Ganho	0	56.25	0.003
11p15.5	1,177,920	1,326,762		Ganho	0	50.0	0.008
16p13.3	1,062,920	1,341,725		Ganho	0	56.25	0.003
20q13.33	60,236,430	60,374,551		Ganho	0	93.75	0.001
20q13.33	60,374,551	61,137,054		Ganho	0	100.0	0.008
20q13.33	61,137,054	61,645,574		Ganho	0	93.75	0.007
20q13.33	61,645,574	61,684,607		Ganho	0	81.25	0.003
Região cromossômica	Início	Término	Tipo tumoral	Evento	Frequência Cluster 3 (%)	Frequência Cluster 2 (%)	P- Valor
11q13.1	65.975.701	66.296.450		Ganho	0	62.5	0.003
11q13.1	66.296.450	66.361.467		Ganho	0	56.2	0.004
11q13.1	66.361.467	66.712.607		Ganho	0	50.0	0.009



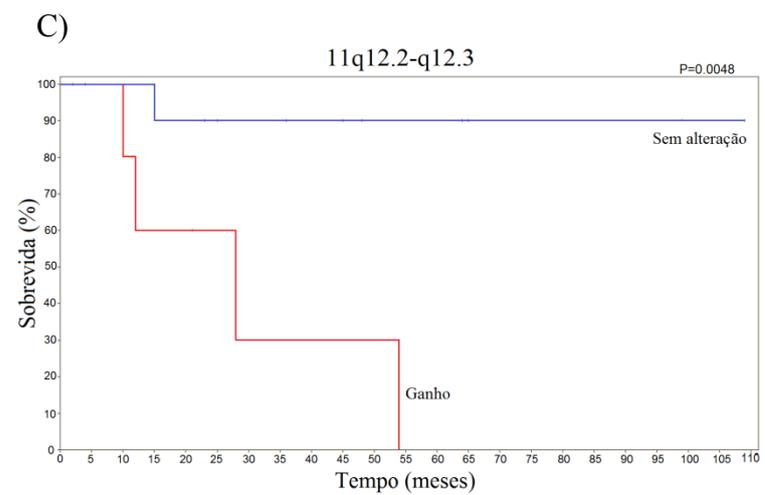
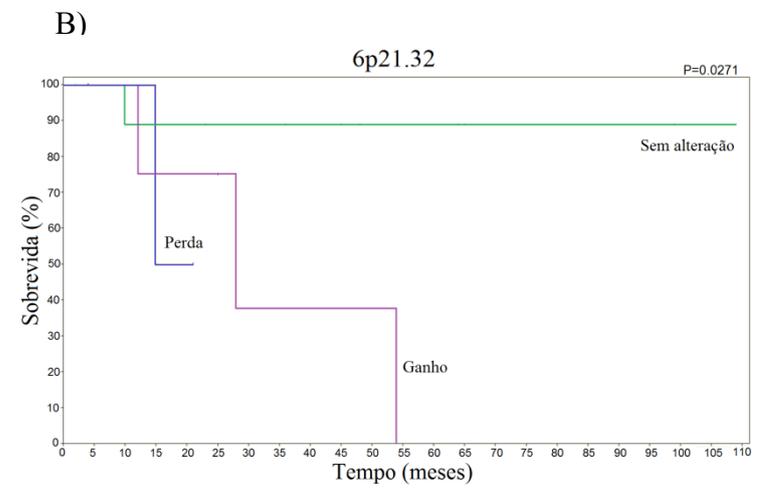
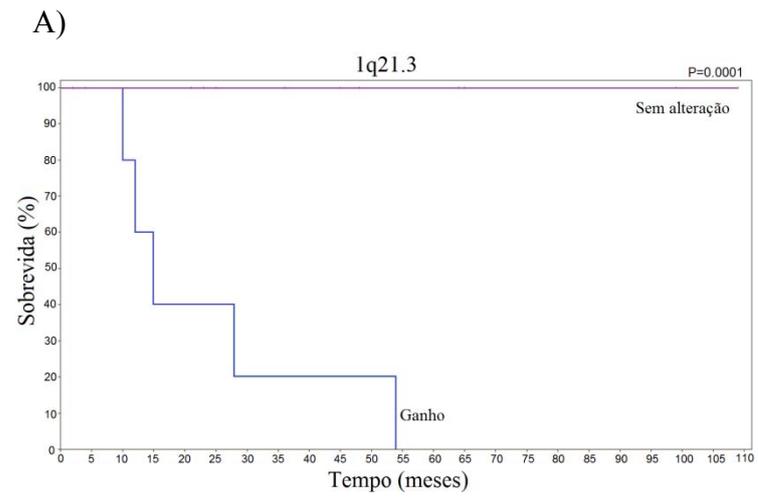
## 5.6 ANÁLISE DA SOBREVIDA GLOBAL E RELAÇÃO COM PADRÕES GENÔMICOS NAS AMOSTRAS DE SARCOMAS PLEOMÓRFICOS INDIFERENCIADOS E LEIOMIOSSARCOMAS

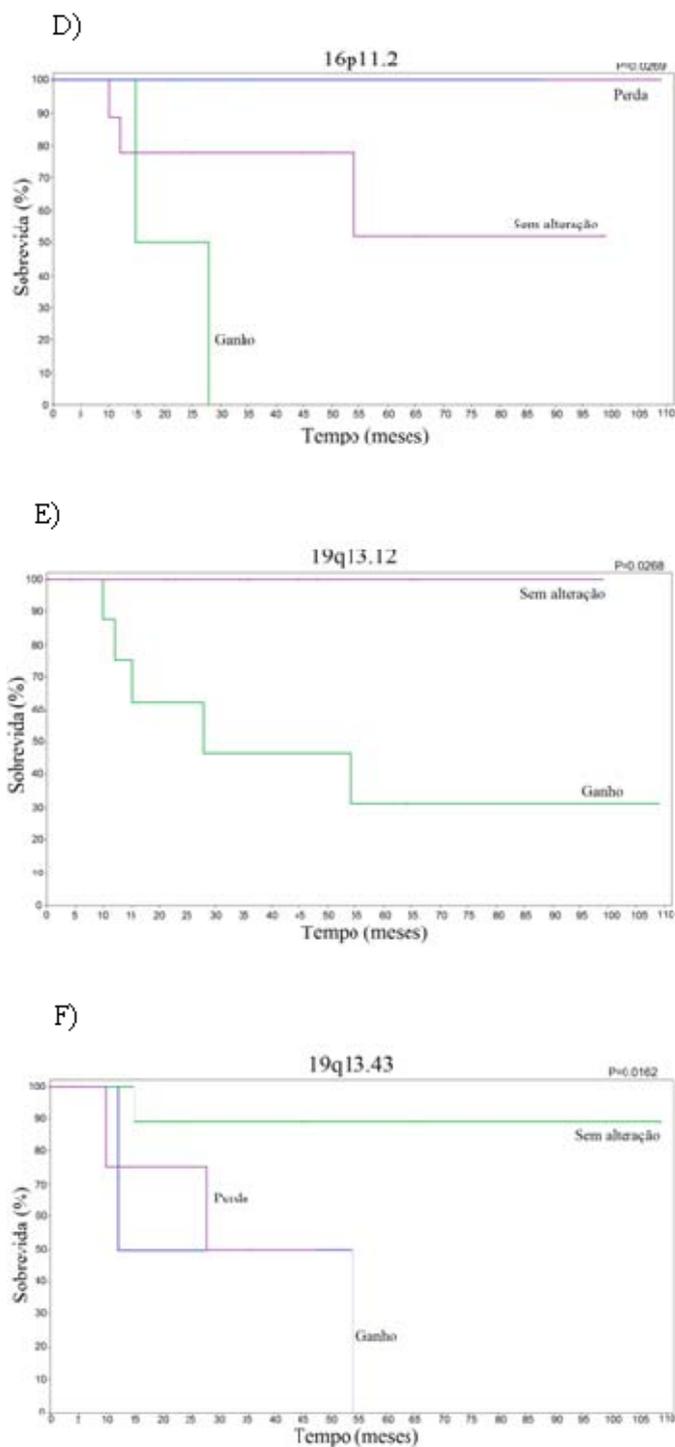
Os 37 pacientes avaliados apresentavam seguimento médio de 22,1 e 38, 8 meses para SPI e LMS, respectivamente. Todos os óbitos observados nesta casuística foram decorrentes da doença (câncer). Os dados de sobrevida global (*overall survival*, OVS) foram calculados como o tempo entre a data do diagnóstico e a última informação do paciente. Todas as alterações estatisticamente significativas observadas nos dois grupos tumorais avaliados ( $P < 0,05$ ; Tabelas 4 e 5) e os grupos detectados nas análises de agrupamento hierárquico (*clusters 1, 2 e 3*) foram comparados com os dados de sobrevida.

Não foram obtidos resultados significativos entre a sobrevida global dos pacientes na análise dos três diferentes *clusters* ( $P < 0,05$ ; Figura 17A). Entretanto, foi detectada sobrevida significativamente reduzida em pacientes com SPI que apresentavam perdas em 1q21.1-q21.2 em relação aos ganhos na mesma região ( $P = 0,0019$ ; Figura 17B). Nas amostras de LMS, foram observadas associações significativas entre as menores taxas de sobrevida e a presença de regiões envolvidas em ganhos, incluindo 1q21.3 ( $P = 0,0001$ ), 6p21.32 ( $P = 0,027$ ), 11q12.2-q12.3 ( $P = 0,005$ ), 16p11.2 ( $P = 0,027$ ), 19q13.12 ( $P = 0,026$ ) e 19q13.43 ( $P = 0,016$ ) (Figuras 18A a F).



**Figura 17** - Curvas de *Kaplan-Meier* segundo alterações genômicas nos casos sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI) e para cada *cluster* avaliados por CGH-array. (A) Redução da taxa de sobrevida global foi significativamente associada com perda genômica em 1q21.1-q21.2 ( $P = 0,0019$ ). Não foram observados valores significativos de OVS para outras regiões de perdas ou ganhos considerando as regiões que foram estatisticamente significativas em SPI. (B) Não foi observada significância estatística segundo o padrão de complexidade genômica presente nos três clusters. Adaptação das imagens obtidas no programa *Nexus version 6.0*.





**Figura 18** - Curvas de *Kaplan-Meier* segundo alterações genômicas nos casos leiomiossarcomas (LMS) avaliados por CGH-array. A redução da taxa de sobrevida global foi significativamente associada com as seguintes alterações cromossômicas envolvidas em ganhos: (A) 1q21.3 ( $P = 0,0001$ ), (B) 6p21.32 ( $P = 0,027$ ), (C) 11q12.2-q12.3 ( $P = 0,005$ ), (D) 16p11.2 ( $P = 0,027$ ), (E) 19q13.12 ( $P = 0,026$ ) e (F) 19q13.43 ( $P = 0,016$ ). Não foram observados valores significativos de OVS para outras regiões de perdas ou ganhos considerando as regiões que foram estatisticamente significativas em LMS. Adaptação das imagens obtidas no programa *Nexus version 6.0*.

Foi realizada uma análise multivariada com o intuito de identificar fatores prognósticos independentes para o grupo de pacientes com sarcomas pleomórficos e leiomiossarcomas. Nesta avaliação, foram consideradas as características clinicopatológicas (tamanho, profundidade, topologia, tratamento e recorrência local) e as alterações genômicas que foram significativas nas análises univariadas.

Esta análise revelou que o aumento do número de cópias em 1q21.3 mostrou-se significativamente associado com risco de morte pela doença em leiomiossarcomas ( $P = 0,019$ , risco relativo = 13,76; intervalo de confiança de 95% = 1,534-123,427). O risco associado a esta alteração foi considerado como independente de qualquer outra característica tumoral (ex., como tamanho, topologia, etc). Pacientes portadores do ganho em 1q21.3 apresentam um risco de morte pela doença 13,76 vezes maior quando comparado aqueles que não apresentam esta alteração.

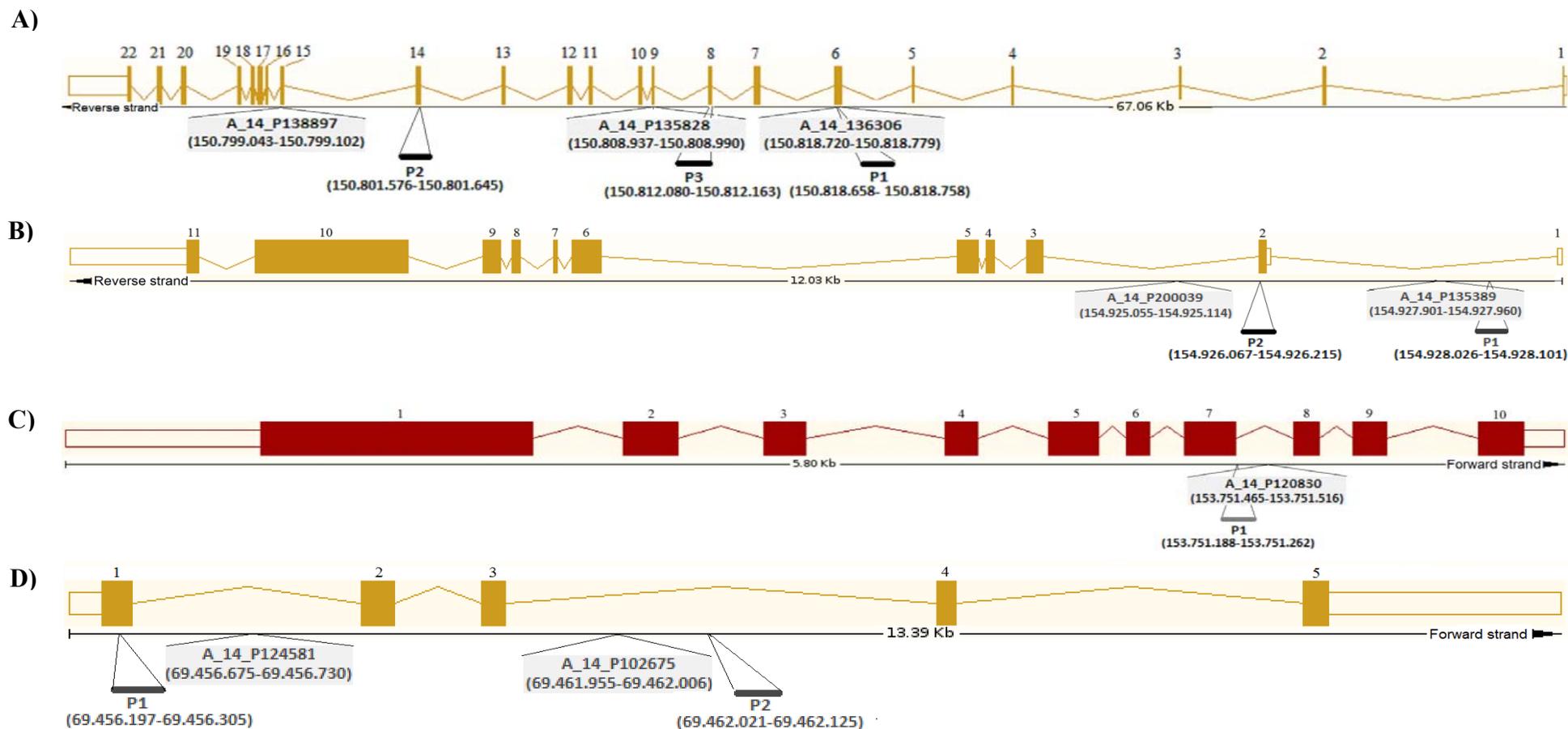
Na análise multivariada, nenhuma característica clínica foi considerada como fator de risco independente.

## 5.7 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO DNA PELA PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

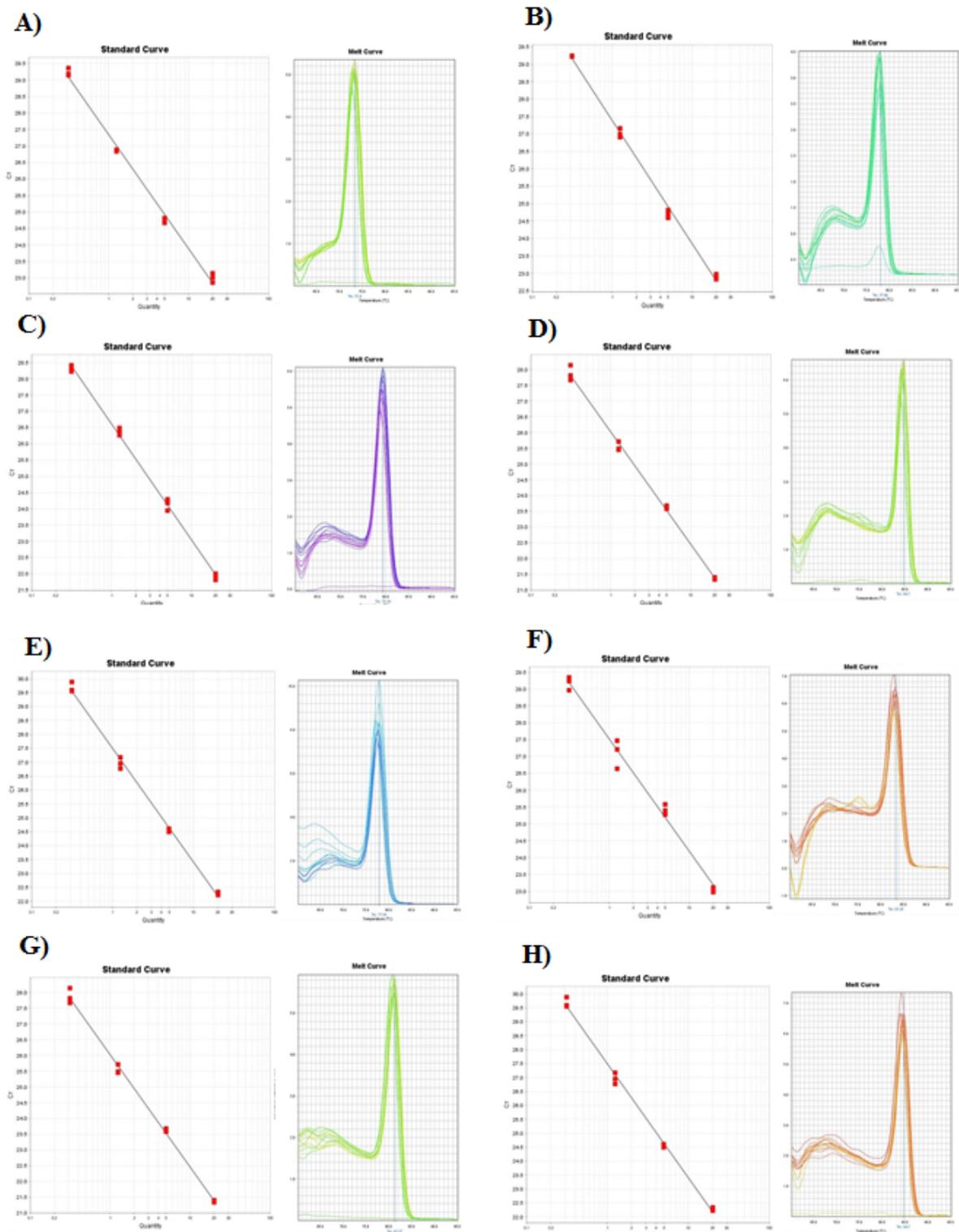
A análise pela CGH-array revelou regiões (100 Kb até 4 Mb) significativamente alteradas em SPI e LMS (Tabelas 4 e 5). Com o propósito de explorar estas alterações, foram selecionados quatro genes para confirmar as alterações no número de cópias do DNA em 1q21.1-q21.2 (*ARNT*), 1q21.3 (*PBXIP1* e *SCL27A3*) e 11q13.2-q13.3 (*CCND1*). A metodologia de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi aplicada em 16 SPI e 11 LMS, previamente avaliados pela CGH-array (casos marcados \* na Tabela 2). A Figura 19 ilustra a localização dos iniciadores nos quatro genes avaliados.

Oito pares de iniciadores (*primers*; Tabela 1) foram desenhados delimitando regiões marcadoras com cobertura da mesma sequência da sonda (*ARNT*-P1) presentes na plataforma (*Agilent 4x44K*), assim como, foram selecionadas regiões que flanqueavam estas sondas para determinar a extensão das sequências alteradas (*ARNT*-P2, *PBXIP1*-P2, *SLC27A3*-P1 e *CCND1*-P2). Em adição, os iniciadores também foram desenhados em regiões de junções entre os íntrons e os éxons para verificar o envolvimento de alterações em éxons ou nos sítios de *splicing* 5' e 3' (*ARNT*-P3, *PBXIP1*-P1 e *CCND1*-P1). Embora a maioria das sondas esteja mapeada em íntrons, duas sondas estão localizadas em regiões exônicas, incluindo aquelas representativas dos genes *SLC27A3* (uma marcador) e *ARNT* (um marcador). Entre os 10 controles saudáveis (controle biológico) não foram observadas alterações no número de cópias nas regiões envolvendo os genes avaliados.

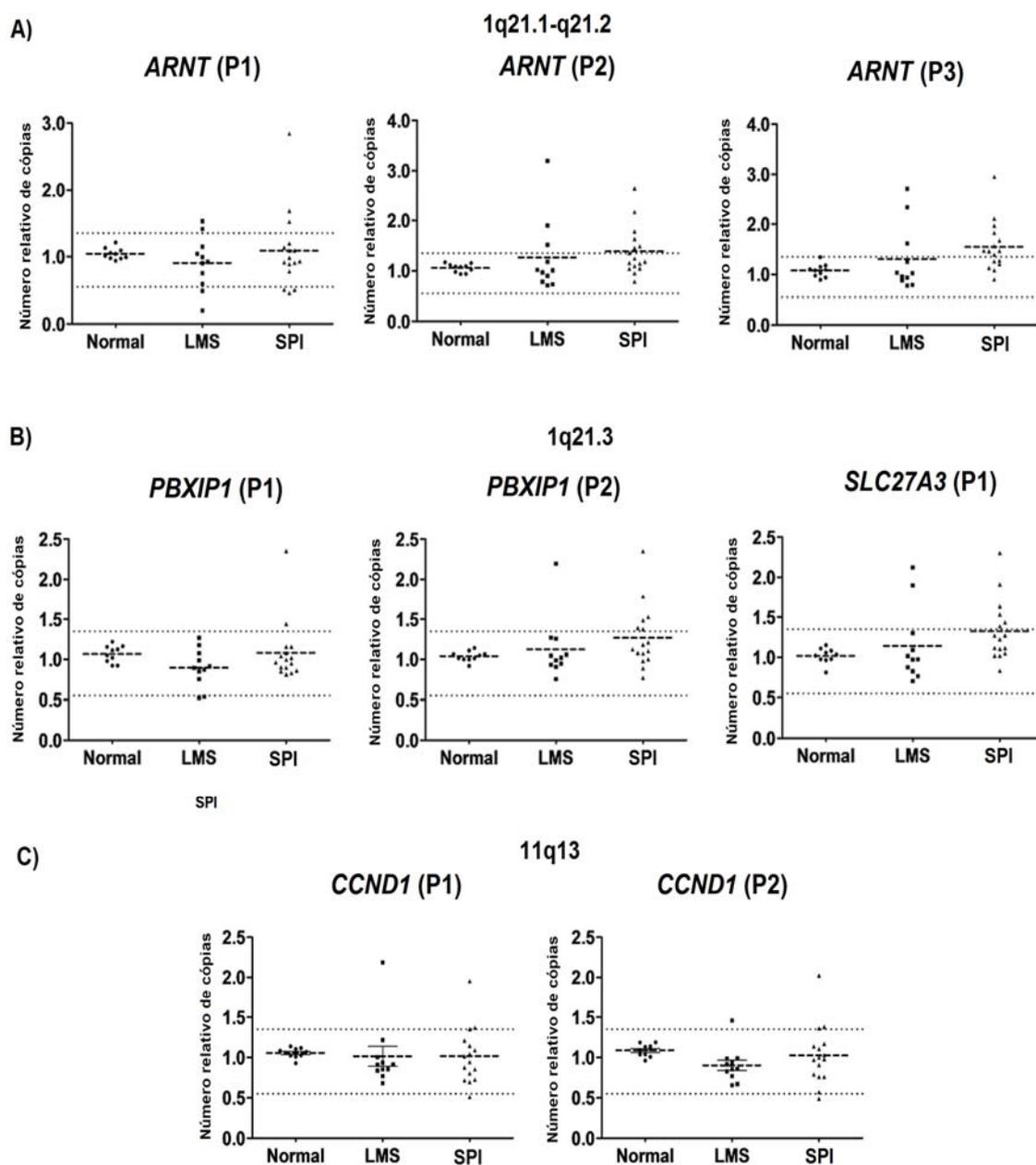
A construção de curvas-padrão a partir de diluições de DNA de um *pool* de amostras de SPI e LMS foi realizada para os oito pares de iniciadores. Foram considerados somente os ensaios que apresentaram eficiências variando de 90-110%, o que indica que ao final de cada ciclo o transcrito molde é duplicado. Todos os oito pares de iniciadores avaliados apresentaram resultados satisfatórios de eficiência e especificidade e foram utilizados nas análises: *ARNT\_P1*: 94,9%; *ARNT\_P2*: 92%; *ARNT\_P3*: 91%; *PBXIP1\_P1*: 97,6%; *PBXIP1\_P2*: 93,9%, *SLC27A3\_P1*: 99,6%, (F), *CCND1\_P1*: 91% e *CCND1\_P2*: 96,8% (Figura 20). As reações foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% e foi confirmada a extensão do produto amplificado e ausência de amplificação inespecífica.



**Figura 19** - Ideogramas demonstrando a localização dos quatro genes (*ARNT*, *PBXIP1*, *SLC27A3* e *CCND1*) selecionados para a avaliação das alterações no número de cópias em 11 LMS e 16 SP usando a PCR quantitativa em tempo real. As regiões foram selecionadas de acordo com a análise de CGH *array*. Para esta abordagem foram desenhados oito pares de iniciadores flanqueando os genes selecionados incluindo (A) três iniciadores para *ARNT* (*ARNT*-P1, *ARNT*-P2 e *ARNT*-P3), (B) dois para *PBXIP1* (*PBXIP1*-P1 e *PBXIP1*-P2), (C) um para *SLC27A3* (*SLC27A3*-P1) e (D) dois para *CCND1* (*CCND1*-P1 e *CCND1*-P2). Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa *Primer-Blast online software* (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e as sequências genômicas de DNA de regiões candidatas foram obtidas a partir do *website Ensembl Genome Browser* (GRCh37/hg19 *Human Reference Assembly*; Fevereiro de 2009).



**Figura 20** - Representação da curva-padrão (esquerda) e curva de dissociação (direita) obtidas para os oito iniciadores presentes em cada um dos quatro genes avaliados por qPCR: *ARNT\_P1* (A), *ARNT\_P2* (B), *ARNT\_P3* (C), *PBXIP1\_P1* (D), *PBXIP1\_P2* (E), *SLC27A3\_P1* (F), *CCND1\_P1* (G) e *CCND1\_P2* (H). As eficiências foram satisfatórias e variaram de 90-100% (vide texto) e as curvas de dissociação demonstraram a especificidade das reações.



**Figura 21** - Representação gráfica da avaliação do número de cópias genômicas nas amostras de sarcoma pleomórfico indiferenciado (16) e leiomiossarcoma (11) pela metodologia de PCR quantitativa em tempo real (qPCR). Quatro genes foram avaliados em (A) 1q21.1-q21.2 (*ARNT*), (B) 1q21.3 (*PBXIP1* e *SCL27A3*) e (C) 11q13.2-q13.3 (*CCND1*). Os valores estabelecidos para cada alteração genômica foram baseados no valor teórico para o genoma diploide, sendo 0,10 para deleção homozigota, 0,55 para deleção heterozigota, 1,35 para ganho de uma cópia e 1,85 para valores acima de duas cópias e alto nível de ganhos. O intervalo entre esses valores foi considerado como normal (0,55 a 1,35) e está delimitado pela linha pontilhada nos gráficos. Normal: controle biológico; LMS: leiomiossarcoma; SPI: sarcoma pleomórfico indiferenciado. As imagens foram geradas pelo programa *Graphpad Prism 5*.

Os resultados da análise das alterações do número de cópias do DNA para os quatro genes foram compilados na Figura 21. Um aumento do número de cópias do gene *ARNT*, envolvendo todos os marcadores (*ARNT*-P1, *ARNT*-P2 e *ARNT*-P3), foi observado nos dois grupos tumorais, embora estas alterações tenham sido prevalentes nos SPI. Das 10 amostras de SPI que apresentaram ganhos envolvendo o marcador *ARNT*-P3 (junção íntron-éxon 7-8) (SP3, SP4, SP7, SP8, SP9, SP13, SP16, SP20, SP21 e SP23), sete exibiram um aumento do marcador *ARNT*-P2 (éxon 14) (SP3, SP7, SP8, SP9, SP20, SP21 e SP23). Em adição, três casos com ganho na região envolvendo os iniciadores *ARNT*-P1 (junção éxon-íntron 6-6) também apresentaram ganhos nas regiões dos iniciadores *ARNT*-P2 e *ARNT*-P3 (SP7, SP8 e SP9). Para as amostras de LMS, foram observados três casos com aumento do número de cópias envolvendo *ARNT*-P2 e *ARNT*-P3 (LMS4, LMS7 e LMS18), dois dos quais também apresentaram alterações em *ARNT*-P1 (LMS4 e LMS7). De modo geral, as regiões de ganhos que envolveram todos os marcadores para o gene *ARNT* (*ARNT*-P1, P2 e P3) foram encontradas em SPI (SP7, SP8 e SP9) e LMS (LMS4 e LMS7), sugerindo uma extensa região de ganhos envolvendo aproximadamente 17 Kb no gene *ARNT* (Figura 21A).

Semelhante ao observado para o gene *ARNT*, os ganhos envolvendo o gene *PBXIP1* foram prevalentes em SPI. Nos marcadores mapeados em *PBXIP1*, o aumento do número de cópias em *PBXIP1*-P1 (junção éxon-íntron 2-2) e *PBXIP1*-P2 (íntron 1) foi observado em 2/16 (SP7 e SP9) e em 6/16 (SP7, SP9, SP13, SP20, SP21, SP22 e SP23) amostras de SP, respectivamente. Dois casos apresentaram ganhos de ambas às sondas, compreendendo uma região de aproximadamente 2 Kb (SP7 e SP9). Em LMS, as alterações no gene *PBXIP1* foram observadas em três

tumores (LMS7, LMS18 e LMS22). Da mesma forma, foram observados ganhos em 6/16 SPI (SP3, SP4, SP7, SP9, SP20 e SP21) e 2/11 LMS (LMS7 e LMS18) para o marcador *SLC27A3*-P1 (éxon localizado próximos (éxon 7) à 200 pb da região da sonda do gene *SLC27A3* (intron 7) (Figura 21B).

Para a análise dos marcadores representativos do gene *CCND1*, foram observados ganhos e perdas envolvendo simultaneamente as duas sondas (*CCND1*-P1 e *CCND1*-P2) em três (SP2, SP20 e SP22) e em um caso (SP7) de SPI, respectivamente. Para LMS, os ganhos foram observados em duas amostras envolvendo marcadores diferentes (Figura 21C).

É interessante notar que os genes *ARNT*, *PXIPI* e *SCL27A3* estão mapeados em 1q21, de forma que as sondas representativas destes genes correspondem a uma região de aproximadamente 4.12 Mb (*amplicon*). Os ganhos envolvendo a região delimitada pelas três sondas foram observados em dois casos de SPI (SP7 e SP9), sendo que um alto nível de ganhos para esta região foi observado em um caso (SP9). Este padrão de ganhos envolvendo os três genes não foi detectado em LMS. De modo geral, os ganhos envolvendo os genes *ARNT*, *PBXIP1* e *SCL27A3* confirmam os resultados detectados na análise de CGH-*array*.

## 6 DISCUSSÃO

Os sarcomas de partes moles (SPM) são um grande grupo de neoplasias malignas de origem mesenquimal que exibem características clinico-morfológicas heterogêneas. No entanto, a maioria dos sarcomas não apresenta uma linhagem de diferenciação celular definida, representando um grande desafio diagnóstico para os patologistas (NIELSEN e WEST 2010). Na maioria dos casos, a classificação precisa dos sarcomas é apenas parcialmente possível, uma vez que os critérios vigentes de classificação histopatológica são muitas vezes inconclusivos e não refletem a complexidade molecular destes tumores (OSUNA e DE ALAVA 2009). Dessa forma, uma fração considerável dos sarcomas não é classificada precisamente ou são agrupados em outras entidades, como é observado nos sarcomas pleomórficos indiferenciados (SPI) (GUILLOU e AURIAS 2010; KONSTANTINOPOULOS et al. 2010).

A avaliação de alterações genômicas e do padrão de expressão gênica em larga escala tem sido realizada para caracterizar perfis genéticos em sarcomas de partes moles. Entretanto, estes estudos são limitados em decorrência do tamanho da casuística ou devido à seleção das amostras e, portanto, os modelos que seriam clinicamente aplicáveis para a classificação e o diagnóstico dos SPM não foram relatados ou não foram validados de forma independente (BAIRD et al. 2005; HENDERSON et al. 2005). Em adição, pouco é conhecido a respeito das alterações genéticas e moleculares associadas com a evolução clínica dos sarcomas com

cariótipos complexos, particularmente dos sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas.

Atualmente, o termo SPI (também denominado SPI/FHM) é utilizado para designar SPM que não apresentam uma linha de diferenciação celular específica e onde são excluídas as alterações associadas à diferenciação epitelial, melanocítica e linfoide; sendo, portanto realizado um diagnóstico por exclusão (DEI TOS 2006; FLETCHER 2006; THWAY 2009). No entanto, ainda não está completamente elucidado se os sarcomas pleomórficos indiferenciados representam um padrão morfológico compartilhado por diferentes neoplasias que, independentemente da sua diferenciação, tornaram-se progressivamente mais indiferenciados ou se esses tumores surgiram a partir da transformação de células-tronco mesenquimais (MSC) (TOLAR et al. 2007; PENNACCHIOLI et al. 2012).

Considerando a hipótese da origem a partir de MSC, MATUSHANSKY et al. (2007) utilizaram um painel de genes que se expressam especificamente em células-tronco mesenquimais em amostras de MSC humanas, SPI e outros subtipos de sarcoma com o intuito de avaliar o papel das MSC na formação dos SPI. A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, a partir da assinatura destes genes, revelou que as MSC humanas se agruparam exclusivamente com os SPI.

Por outro lado, vários estudos usando as metodologias de CGH-*array* e cDNA microarray sugeriram que os SPI não são uma entidade biológica distinta, mas representam uma coleção heterogênea de sarcomas de alto grau (NIELSEN et al. 2002; SEGAL et al. 2003; BAIRD et al. 2005; FRANCIS et al. 2007; NAKAYAMA et al. 2007; CARNEIRO et al. 2009; BECK et al. 2010; KONSTANTINOPOULOS et al. 2010). Embora a maioria destes estudos em larga escala utilize plataformas

distintas contendo diferentes sequências gênicas, o padrão de alterações genômicas e o perfil de expressão gênica demonstram uma grande similaridade entre os sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas, mesmo quando avaliados com outros subtipos tumorais (FLETCHER et al. 2001; LEE et al. 2003; FRANCIS et al. 2007; CARNEIRO et al. 2009; GIBault et al. 2010; CHIBON et al. 2010; KRESSE et al. 2010; MILLS et al. 2011).

Considerando-se a raridade do sarcoma pleomórfico indiferenciado, o número de amostras incluídos no presente estudo foi limitado. No entanto, foram avaliadas apenas amostras de tumores primários e de recorrência local de pacientes que não foram submetidos a tratamento quimioterápico ou radioterápico prévio à coleta do material. Em literatura, raros estudos incluem esses dados, resultando em alterações genéticas que podem ser decorrentes do tratamento e não do processo tumoral.

Na presente casuística, todos os tumores foram revisados por um único patologista que utilizou análises de imunoistoquímica para corroborar o diagnóstico histopatológico. Assim, não há dados díspares de análises resultantes da variabilidade entre os avaliadores. Os principais marcadores musculares utilizados (AML, HHF-35, desmina, calponina e caldesmon), previamente descritos em literatura como úteis para o diagnóstico, foram também aplicados entre os casos deste estudo. Entretanto, uma grande variabilidade morfológica e do padrão de expressão proteica por imunoistoquímica foi observada em 13 casos (SP1, SP2, SP6, SP7, SP8, SP13, SP16, SP19, LMS6, LMS7, LMS16, LMS19 e LMS20), dificultando o diagnóstico clínico. Estas amostras com diagnóstico complexo (ADC) foram caracterizadas por apresentarem uma morfologia pleomórfica semelhante à mixofibrosarcoma, leiomiossarcomas e lipossarcoma desdiferenciado; porém, a falta

de evidências histológicas e dos marcadores avaliados sugeriu que vários casos fossem classificados como SPI (SP1, SP2, SP6, SP7, SP8, SP13, SP16 e SP19). Embora tenham sido classificados desta forma, não é possível descartar completamente as outras possibilidades diagnósticas. Dessa forma, considerando que o diagnóstico dos sarcomas pleomórficos indiferenciados é complexo, as análises genômicas e outras técnicas em larga escala podem contribuir para a identificação de marcadores e de vias biológicas específicas, os quais podem ser traduzidos como ferramentas adicionais para classificação e diagnóstico destes tumores na prática clínica.

Neste estudo foram investigadas 20 amostras de SPI e 17 amostras de LMS, utilizando-se a técnica de CGH-array na plataforma *Agilent Human 4x44K CGH Microarrays*. Na análise global das regiões cromossômicas alteradas, o número de ganhos e perdas genômicas nas amostras de SPI foi superior ao observado nos LMS (2.003 e 910, respectivamente), incluindo a detecção de grandes segmentos cromossômicos (maiores que 10 Mb) em casos específicos. Em adição, foram identificadas 31 regiões cromossômicas significativamente recorrentes envolvidas com aumento e diminuição do número de cópias do DNA (presentes em mais de 20% dos casos). Estas regiões foram comparadas com os dados clínicos, sendo observadas diferenças significativas com características de pior prognóstico, particularmente nas amostras de leiomiossarcomas.

As regiões genômicas mínimas significativamente recorrentes nos SPI e LMS foram comparadas com o banco de dados de variações no número de cópias do DNA (do inglês, *CNV*) previamente descritas (*DGV, Database of Genomic Variants*), para avaliar aquelas que teriam uma importância funcional e impacto fisiológico em SPI e

LMS. As CNVs são definidas como um segmento de DNA com tamanho maior que 1 Kb e que, quando comparados com um genoma referência, apresentam variação no seu número de cópias (FEUK et al. 2006; LUPSKI 2007). O mecanismo de desenvolvimento das CNVs ainda não foi completamente esclarecido, mas deleções, duplicações, inversões, inserções e translocações são alguns dos eventos que resultam em CNV (ALMAL e PADH 2012).

Muitas destas variações genômicas têm um papel fundamental na suscetibilidade à doenças específicas, na resposta a drogas e no desenvolvimento do câncer (ESTIVILL e ARMENGOL 2007; SHLIEN e MALKIN 2009). Em câncer, as CNV foram catalogadas de acordo com a frequência que são descritas na população (rara ou comum), assim como, se estas regiões coincidem com genes previamente relatados em literatura como associados ao fenótipo tumoral (ALMAL e PADH 2012).

Nos sarcomas pleomórficos indiferenciados foram identificadas 16 alterações genômicas significativas, incluindo ganhos em 1q21.1-q21.2, 1q21.3-q23.1, 2q11.1-q11.2, 3p12.1-p11.2, 7q22.1, 8p11.21, 9q34.11, 11p15.5, 11q13.1, 11q13.1-q13.2, 16p13.3, 16q24.3, 18p11.32, 20p11.21 e 20q13.33 e a perda em 3p26.3. Os dados obtidos concordam com os descritos em literatura, os quais incluem ganhos recorrentes em SPI envolvendo 1q21, 7q21-qter, 11q13.2, 16p13 e 20q (FORUS et al. 1995; MAIRAL et al. 1999; SIMONS et al. 2000; WENG et al. 2003; LARRAMENDY et al. 2008; CARNEIRO et al. 2009; KRESSE et al. 2010). Os ganhos recorrentes em 20q13.33, 1q21.3-q23.1 e 7q22.1, assim como a perda em 3p26.3, foram observados em mais 50% dos SPI avaliados em nosso estudo,

sugerindo que estas regiões genômicas devem conter genes críticos associados a esse processo tumoral.

Entre os 55 genes mapeados em 20q13.33 (ganhos genômicos) estão incluídos aqueles associados com a inibição da apoptose (*BIRC7* e *EEF1A2*), assim como envolvidos em angiogênese (*LAMA5*). Em adição, nesta região estão mapeados seis microRNAs (*MIR1-1*, *MIR124-3*, *MIR133A2*, *MIR3196*, *MIR4326* e *MIR4758*) que também estavam alterados quanto ao número de cópias. Com o intuito de identificar um perfil de microRNA específico para cada subtipo tumoral, SUBRAMANIAN et al. (2008) avaliaram um painel de 87 microRNAs em sete subtipos de sarcomas, incluindo seis LMS. Os autores observaram um aumento significativo na expressão de *miR-1*, *miR-133a* e *miR-133b* em LMS quando comparados às amostras normais de músculo liso. Um aumento significativo da expressão do *miR-1* e *miR-133a* foi descrito previamente em leiomiossarcomas e rabdomiossarcomas, onde foram associados com proliferação de mioblastos e miogênese (CHEN et al. 2006).

Em SPI, foram detectados ganhos (oito casos) e perdas (dois casos) em 1q21.1-q21.2, sendo observado um aumento do risco de morte pela doença nos pacientes que apresentaram perdas de 1q21.1-q21.2 em relação aqueles pacientes que apresentaram ganhos na mesma região ( $P = 0,0019$ ). Sessenta e quatro genes alterados estavam mapeados em 1q21.1-q21.2, incluindo aqueles que codificam proteínas que atuam na regulação da transcrição, como os membros da família das *histonas H2 (HIST2H family)*, proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina (*SETDB1*) e no mecanismo de *splicing* do RNA (*PRP3*, *PRPF3*, *PSF* e *SF3B4*), assim como, proteínas envolvidas na formação de organelas celulares (*GOLPH3L*),

metabolismo de xenobióticos (*ARNT*), osteogênese (*ECMI*) e resposta imune (*FCGR1A*, *FCGR1B* e *FCGR1C*). Vários estudos demonstraram um alto nível de amplificação na região 1q21-q22 em sarcomas pleomórficos indiferenciados (MAIRAL et al. 2000; DERRÉ et al. 2001; SIMONS et al. 2000; WENG et al. 2003; KRESSE et al. 2010) e em uma variedade de outros sarcomas, incluindo osteossarcomas e lipossarcomas (FORUS et al. 1998; TARKKANEN et al. 2006; LOUIS-BRENNETOT et al. 2011). No entanto, nenhuma associação clínica envolvendo esta região foi observada nestes subgrupos tumorais.

Outras regiões significativamente recorrentes foram as perdas em 3p26.3 e os ganhos em 7q22.1. Quatro genes apresentaram diminuição do número de cópias em 3p26.3, sendo *CALL1* e *CHL1* relacionados a adesão celular e desenvolvimento neuronal. Em 7q22.1 foram identificados 61 genes que estão relacionados a processos fundamentais para sobrevivência da célula tumoral, dos quais muitos estavam associados com remodelamento da cromatina (*ACTL6B*), replicação do DNA (*ACHE*), regulação da transcrição (*LRCH4*, *SAP25* e *TSC22D4*) e processamento do miRNA (*ARS2* e *SRRT*). Também foram observados genes que codificam proteínas associadas com inibição da apoptose (*EPO*), formação da membrana basal (*PCOLCE* e *PLOD3*), motilidade celular (*TRIP6*), angiogênese (*EPHB4* e *SERPINE1*), metabolismos de glicose e glicerol (*VGF* e *MOGAT3*).

A diminuição do número de cópias presente em 18p11.32 foi significativamente associada a casos de SPI presentes em pacientes que estavam vivos com a doença ( $P = 0,016$ ). Em nossa casuística, foram observados apenas três casos de pacientes que estavam vivos com a doença (SP22 e SP23) durante o período deste estudo. No entanto, estes pacientes desenvolveram metástase à distância para

sítios específicos (pulmão, ossos e peritônio) em um período inferior a quatro meses. Embora em um pequeno número de casos, a perda em 18p11.32 parece favorecer um fenótipo de pior prognóstico. Dessa forma, nós investigamos os genes que estavam mapeados nesta região, entre os quais foram identificados genes envolvidos na determinação da posição dos centrômeros e segregação dos cromossomos durante a mitose (*CETNI*), reparo do DNA (*TYMS*), processamento do RNA (*THOC1*), morte celular (*CLUL1*), aumento da permeabilidade vascular e coagulação (*YES1*).

Em contraste, os ganhos em 16q24.3 estavam significativamente presentes em tumores de pacientes que estão vivos sem a doença ( $P = 0,043$ ). Para estes pacientes (SP1, SP16, SP17 e SP20) o tempo de seguimento clínico foi em média 33,8 meses, embora o caso SP16 tenha apresentado um seguimento inferior a dois meses. Nenhum paciente apresentou recorrência local ou desenvolveu metástase durante o período deste estudo. Em adição, também não foi observado comprometimento neoplásico das margens cirúrgicas nestes casos. A avaliação das margens cirúrgicas quanto à presença de tecido tumoral é um importante fator prognóstico em diversos sarcomas, onde estudos demonstram que as chances de sobrevida são maiores na presença de margens livres (GANJOO e JACOBS 2010). A associação do ganho em 16q24.3 com pacientes que estão vivos sem a doença, assim como, a ausência de margens cirúrgicas comprometidas nestes pacientes sugere que esta alteração possa conter genes importantes que contribuem para o controle da doença. Investigando esta região foram observados 22 genes, incluindo aqueles associados à miogênese (*CDH15*), regulação do ciclo celular (*CDK10*), replicação do DNA (*TYMS*), síntese proteica (*RPL13*), biogênese de organelas (*SPG7*) e regulação transcricional (*ANKRD11*).

As amplificações gênicas são características essenciais de cânceres avançados e estão associadas com mecanismos de resistência a drogas no tratamento clínico do câncer (MYLLYKANGAS e KNUUTILA 2006; SANTARIUS et al. 2010). Entre as regiões cromossômicas significantes em SPI, um alto nível de ganhos em 3p12.1-p11.2 (85.96-87.62 Mb) foi frequentemente observada em cinco casos avaliados (SP2, SP9, SP15, SP19 e SP22). Os genes *BC040985*, *BC050344*, *CADM2*, *CHMP2B*, *POU1F1* e *VGLL3* estavam mapeados nessa região, incluindo o microRNA *MIR4795*.

Um alto nível de ganhos em 3p11-p12 também foi previamente relatado em um subconjunto de SPI por análises de CGH-array (CARNEIRO et al. 2009; KRESSE et al. 2010). Em outro estudo, níveis elevados de expressão de *CHMP2B* e *VGLL3* já foram descritos em SPI com padrão inflamatório (IFHM) que apresentavam concomitante amplificação da região 86.30–87.74 Mb em 3p11.1-12.1 (HALLOR et al. 2009). A classificação da WHO para os sarcomas pleomórficos indiferenciados considera três categorias: (1) sarcoma pleomórfico indiferenciado/FHM pleomórfico, (2) sarcoma pleomórfico indiferenciado com células gigantes/FHM com células gigantes e (3) sarcoma pleomórfico indiferenciado com padrão inflamatório/ FHM inflamatório (FLETCHER et al. 2002). O SPI/FHM com padrão inflamatório apresenta um proeminente infiltrado de histiócitos e células inflamatórias. No entanto, semelhante ao observados em SPI do tipo pleomórfico, estes tumores também são caracterizados pela ausência do padrão de diferenciação celular que pode ser compartilhado por diferentes neoplasias como carcinomas, linfomas, leiomiossarcomas e lipossarcomas (HOLLOWOOD e FLETCHER 1995; HISAOKA et al. 1997).

Em uma revisão da literatura, YANG et al. (2009) relataram que as principais alterações numéricas descritas em leiomiossarcomas foram ganhos em 1q12-q31, 1q21, 1p3, 5p15, 6q, 8q24, 15q12-q15, 15q25-q26, 16p, 17p, 17q, 19, 20q e 22q e perdas em 1q42-qter, 1p36, 2p, 2q, 2p15-pter, 3p21-p23, 4q, 8p21-pter, 9p, 10p, 10q23-qter, 11p, 11q23-qter, 13q12-q13, 13q14-21, 13q32-qter, 16q e 18p11. No presente estudo alterações envolvendo 1q21.3, 6p21.32, 11q12.2-q12.3, 16p11.2, 19q13.12 e 19q13.43 foram relacionadas significativamente com redução da sobrevida dos pacientes. Para o nosso conhecimento, não foi reportada uma assinatura de pior prognóstico em leiomiossarcomas.

Neste estudo, ganhos envolvendo uma região de 511 Kb em 1q21.3 foram compartilhadas entre SPI e LMS. Para os SPI, não foi observada nenhuma correlação entre o ganho em 1q21.3-q22 e os dados clínicos ou sobrevida. Entretanto, o ganho envolvendo 1q21.3 foi significativamente associado aos casos de LMS em que os pacientes desenvolveram metástase a distância ( $P = 0,001$ ; LMS4, LMS5, LMS6 e LMS20) e/ou que morreram em decorrência da doença ( $P = 0,002$ ; LMS4, LMS5, LMS6, LMS8 e LMS20).

Similar ao observado no grupo dos SPI, o aumento do número de cópias em 1q21-q22 também foi descrito em vários estudos de CGH cromossômico e CGH-*array* como uma alteração importante em LMS (FORUS et al. 1995; LEVY et al. 2000; HU et al. 2005; YANG et al. 2009; CARNEIRO et al. 2009). Em nosso estudo, a presença de ganhos em 1q21.3 foi considerado como um importante fator de risco de morte pela doença independente de qualquer outra característica do tumor (ex., como tamanho, topologia, etc) em pacientes com leiomiossarcomas. Estes dados

sugerem que os genes mapeados nesta região devem ter papel importante no desenvolvimento de um fenótipo clinicamente agressivo em leiomiossarcomas.

Nesta região, alguns genes observados em nosso estudo (*RAB25*, *MUC1*, *SPRR* e os membros da família *S100*) também foram descritos como importantes marcadores associados ao desenvolvimento de muitos sarcomas (SZYMANSKA et al. 1997; ARMENGOL et al. 1997). Na tentativa de caracterizar os genes mapeados no *amplicon* 1q21-q22 em sarcomas, FORUS et al. (1998) avaliaram o perfil de amplificação pela FISH para sondas representativas de 14 genes, incluindo *MUC1*, *SPRR1B*, *SPRR2A*, *SPRR3* e *S100A6*, em uma série de 35 sarcomas (leiomiossarcomas, lipossarcomas, sarcomas pleomórficos e osteossarcomas) previamente avaliados por CGH cromossômico. Embora em baixa frequência, os autores observaram amplificações para todos os genes avaliados, sendo dois casos de LMS que apresentaram amplificação de *MUC1* e *SPRR3*; porém, nenhuma associação significativa entre as características clínicas e o perfil de amplificação destes genes foi observada neste estudo.

Treze genes da família *S100* também foram identificados nesta região em nosso estudo (*S100A9*, *S100A8*, *S100A7A*, *S100A7L2*, *S100A7*, *S100A6*, *S100A5*, *S100A4*, *S100A3*, *S100A2*, *S100A16*, *S100A14* e *S100A12*). Estas proteínas estão envolvidas na regulação de diversos processos celulares como progressão e diferenciação celular (FUJIWARA et al. 2011). Em estudos utilizando imunohistoquímica e qRT-PCR, o aumento da expressão do gene *S100A4* foi considerado um marcador prognóstico de invasão e metástase em diversas neoplasias humanas, incluindo osteossarcomas (BOYE e MAELANDSMO 2010; FUJIWARA et al. 2011).

Outro candidato nesta região é o gene *S100A6*, que tem sido associado a processos de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (PAWLAK e HELFMAN 2001). LUO et al. (2008) relataram um aumento da expressão do gene *S100A6* por imunistoquímica em mais de 80% das amostras de osteossarcomas. Estes resultados foram significativamente associados com ausência de metástase nestes pacientes. Com o intuito de avaliar um possível mecanismo de supressão de metástase pelo gene *S100A6* em osteossarcomas, os mesmos autores em 2008 usaram um ensaio baseado em siRNA para o gene *S100A6* em quatro culturas primárias de biópsias provenientes de pacientes com osteossarcomas que apresentavam amplificação deste gene. Nas células silenciadas foi observada uma inibição da adesão celular e um aumento da migração celular e invasão, sugerindo que o gene *S100A6* pode ser considerado um marcador importante para osteossarcomas humano com valor prognóstico para a identificação de pacientes sem metástases. Os dados obtidos no presente estudo reforçam o envolvimento destes genes e sua associação com metástases também em LMS.

Em estudo recente utilizando imunistoquímica, WEISSENBACHERE et al. (2011) demonstraram um aumento significativo da expressão do gene *MUC1* em leiomiossarcoma e leiomiomas uterinos em comparação com o miométrio normal. Dessa forma, esse aumento de expressão poderia ser decorrente de alterações no número de cópias genômicas em 1q21.3.

Ganhos envolvendo 11q12.2-q12.3 (LMS4, LMS5, LMS8, LMS20 e LMS23) e 19q13.12 (LMS3, LMS4, LMS5, LMS6, LMS8, LMS16, LMS19, LMS20 e LMS22) foram também associados significativamente com diminuição da sobrevida global dos pacientes com LMS ( $P = 0,005$  e  $P = 0,027$ , respectivamente) e

óbito pela doença ( $P = 0,003$  e  $P = 0,020$ , respectivamente). Em 11q12.2-q12.3 foram identificados 37 genes relacionados com processos de segregação cromossômica (*INCENP*), remodelamento da cromatina e deacetilação das histonas (*MTA2*), regulação da transcrição gênica (*EEFIG*) e processamento do RNA (*TUT1*).

A proteína MTA2, associada ao complexo de remodelamento da cromatina (do inglês; *NuRD*), foi descrita como mediadora no processo de deacetilação da proteína p53, resultando na inibição da parada do crescimento celular e evasão da apoptose (LUO et al. 2000). Os genes do complexo CRC são altamente expressos em células metastáticas tais como carcinomas hepatocelular, mama, coloretal, gástrico, esôfago e carcinoma de pulmão de células não pequenas (CPNPC) (TOH et al. 2000). Em recente estudo, LIU et al. (2012) identificaram uma correlação significativa entre o aumento de expressão nuclear da proteína MTA2 e diminuição da sobrevida global em pacientes com CPNPC, sugerindo um papel importante deste gene na progressão destes tumores. A regulação da acetilação das histonas e o remodelamento da cromatina pelas proteínas do complexo *NURD* interagem com vias de sinalização de fatores de transcrição que governam os processos de progressão tumoral e metástase (MANAVATHI et al. 2007). Dessa forma, os anhos do gene *MTA2*, pela primeira vez descrito em LMS, podem apresentar um importante mecanismo de regulação da expressão deste gene em LMS, sugerindo a realização de novas abordagens de validação para a expressão deste gene nestes sarcomas.

Ganhos em 19q13.12, presentes em 52,9% dos casos, envolveram três genes associados a transdução de sinal, miogênese, catabolismo de aminoácidos e transporte de proteínas (*ARHGAP33*, *NPHS1* e *PRODH2*). A amplificação envolvendo 19p13 foi relacionada com diferentes tipos de neoplasias malignas,

incluindo carcinoma pancreático, carcinoma de ovário e carcinoma de mama (MULERIS et al. 1995; THOMPSON et al. 1996; CURTIS et al. 1998). No entanto, os ganhos em 19q13.12 não são eventos recorrentes em LMS, sendo descritos em casos esporádicos sem relação clínica (WANG et al. 2001; HU et al. 2005; LARRAMENDY et al. 2008). Nosso trabalho foi o primeiro a identificar um fenótipo de mau prognóstico em pacientes portadores de ganhos em 19q13.12, sugerindo um importante marcador no desenvolvimento de LMS.

Todas as regiões significativamente alteradas em SPI e LMS foram comparadas com o banco de dados do DGV (*Database of Genomic Variants*) para a identificação de CNVs (*copy number variation*) raras. No entanto, apenas a região 19q13.12 em LMS foi considerada como CNV rara (regiões com tamanho superior a 100kb e presentes no DGV com frequência menor ou igual a 1%), sugerindo que variação no número de cópias em 19q13.12 pode contribuir para o fenótipo destes LMS.

A presença de recorrência local e metástase são eventos frequentes em LMS, enquanto o tamanho do tumor e o sítio anatômico, particularmente retroperitônio, são preditores de pior prognóstico (GUILLOU e AURIAS 2010). Em nosso estudo, nenhuma associação significativa foi observada entre características de pior prognóstico (redução de sobrevida, presença de metástase ou recorrência) e o tamanho tumoral ou sítio anatômico. Entretanto, entre as oito amostras de leiomiossarcomas que estavam localizadas na região retroperitoneal (LMS6, LMS8, LMS16, LMS17, LMS18, LMS21, LMS22 e LMS23), quatro apresentaram recorrência local (LMS6, LMS16, LMS18 e LMS23) e duas metástase à distância (LMS6 e LMS18).

Em nosso estudo, ganhos em 17q25.1 (41,2%) e 19q13.43 (23,5%), assim como, as perdas em 16p11.2 (23,5%) foram significativamente relacionados com recorrência local. Quarenta genes estavam localizados em 17q25.1, incluindo 13 membros da família das glicoproteínas CD300 e dois genes que atuam na via de sinalização WNT (*NHERF* e *SLC9A3R1*). A proteína NHERF interage com a  $\beta$ -catenina na membrana plasmática, desencadeando a ativação da via WNT que regula o processo de diferenciação celular (SHIBATA et al. 2003). Análises imunohistoquímicas em câncer de mama demonstraram um aumento da expressão da proteína NHERF em tumores com invasão peritumoral e pior prognóstico (MANGIA et al. 2011). Em câncer colorretal, o aumento da expressão nuclear da proteína NHERF1 foi associado com tumores pobremente diferenciados, assim como, com o aumento da expressão das proteínas HIF-1 alfa e TWIST1, que foram observadas nas metástases linfáticas e no fronte invasivo destes tumores (MALFETTONE et al. 2012). Para o nosso conhecimento, nenhum estudo relatou ampliações ou aumento de expressão gênica ou proteica do gene *NHERF1* em leiomiomas.

Outras alterações significantes frequentes nos casos de LMS foram os ganhos em 8q24.3 (47,1%) e a perda em 9p21.3 (41,2%). O aumento do número de cópias em 8q24 foi relatado previamente em LMS por estudos de CGH (OTAÑO-JOOS et al. 2000; WANG et al. 2001; HU et al. 2005), Em 8q24.3 estão mapeados 127 genes, incluindo genes que codificam fatores de transcrição que apresentam motivos *zinc-finger* (*ZNF16*, *ZNF250*, *ZNF251*, *ZNF252*, *ZNF34*, *ZNF517*, *ZNF623*, *ZNF696*, *ZNF7* e *ZNF707*), assim como microRNAs (*MIR1234*, *MIR4664*, *MIR661*, *MIR937* e *MIR939*). Para os LMS, os ganhos em 8q também foram descritos frequentemente em tumores grandes (>5 cm de diâmetro) (EL-RIFAI et al. 1998). Em concordância

com a literatura, 10/12 casos de LMS que apresentaram ganhos em 8q24.3 também eram maiores que 5 cm.

Nas regiões de perdas em 9p21.3 foram identificados dois casos de LMS com perdas homozigotas. Os genes mapeados nesta região estão associados à regulação negativa do ciclo celular (*CDKN2A* e *CDKN2B*), citocinas (*IFNA1*, *IFNA13*, *IFNA14*, *IFNA16*, *IFNA17*, *IFNA2*, *IFNA22P*, *IFNA5*, *IFNA6* e *IFNA8*) e um microRNA (*MIR31*).

O gene supressor de tumor *CDKN2A*, responsável por codificar as proteínas p16<sup>INK4a</sup> e p14<sup>ARF</sup>, regula negativamente a progressão da fase G1 para S no ciclo celular (SHERR 1996). Para avaliar o potencial da proteína p16<sup>INK4a</sup> em LMS, KAWAGUCHI et al. (2003) realizaram uma análise imunoistoquímica em 77 LMS, onde a diminuição da expressão desta proteína foi significativamente associada com redução da sobrevida global nestes pacientes. Em adição, os autores verificaram que 3/49 casos testados apresentavam perdas homozigotas por PCR-SSCP. A deleção homozigótica do gene *CDKN2A* também foi demonstrada em estudos anteriores e é amplamente considerado como um alvo importante associado à deleção em 9p21 em sarcomas, incluindo osteossarcomas e leiomiiossarcomas uterinos (MAELANDSMO et al. 1995; NIELSEN et al. 1998; ZHAI et al. 1999). A deleção do segmento correspondente ao gene *CDKN2A* foi observado em 60% dos 20 casos de SPI avaliados em nossa casuística, sugerindo que a via da proteína p16 pode estar desregulada em SPI e LMS.

Um dos principais desafios no diagnóstico dos SPI é conseguir distingui-los de outros tumores malignos com um grau semelhante de pleomorfismo celular, como observado em leiomiiossarcomas (NIELSEN e WEST 2010). Diante deste desafio, foi

realizada a análise comparativa do perfil de alterações no número de cópias genômicas entre sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas. Entretanto, a análise de agrupamento das amostras baseada no perfil de ganhos e perdas genômicas não permitiu a distinção dos dois grupos tumorais (Figura 16A), similarmente ao reportado em outros estudos (LARRAMENDY et al. 2008; CARNEIRO et al. 2009; KRESSE et al. 2010).

Em 2008, LARRAMENDY et al. analisaram 102 SPI e 82 LMS primários, não tratados previamente, pela técnica de CGH cromossômico e relataram um perfil semelhante de alterações genéticas entre os dois grupos tumorais. Embora, a análise de agrupamento não tenha sido capaz de diferenciar estes SPI e LMS, os autores observaram um cluster (dois LMS e 10 SPI) caracterizado por alto nível de ganhos com 1p33-p34.3, 17q22-q23, 17q25-qter, 19p, 22 p e 22q. Semelhante ao nosso estudo, as amostras de pacientes não tratados também apresentaram ampliações em alguns casos esporádicos, incluindo 17q25.1 (SP23 e LMS18), 19p (SP6, SP8 e SP22) e 22q (SP19 e LMS22).

CARNEIRO et al. (2009) relataram um padrão de alterações similares entre 18 LMS e 31 SPI de extremidades usando a integração dos dados de cDNA microarray (plataforma de 27K) e CGH-array (plataforma de BAC arrays de 32K). A análise de expressão gênica mostrou nove genes diferencialmente expressos (*TAGLN3*, *D4S234E*, *KIAA1729*, *PDLIM5*, *TEAD3*, *TPM2*, *ALDH1B1*, *TRDMT1* e *DHODH*), porém, eles não permitiram distinções entre os subtipos tumorais. Adicionalmente, perdas na região 4q31 (*SMAD1*) e 18q22 (*CDH7*), além da presença de necrose tumoral, foram identificados como preditores independentes de metástases. Estes genes não foram observados entre as regiões genômicas

diferencialmente alteradas entre as 37 amostras avaliadas no nosso estudo. Quando os tumores foram avaliados separadamente, as perdas envolvendo o gene *CDH7* (18q22) foram encontradas em quatro LMS (LMS4, LMS6, LMS8 e LMS22) e em sete SPI (SP2, SP3, SP7, SP8, SP9, SP15 e SP19). Entretanto, diferente dos autores, não identificamos correlação clínica com a perda em 18q22.

As semelhanças genéticas observadas entre SPI e LMS podem ser indicativas de uma origem compartilhada entre estes subtipos tumorais e esta hipótese também foi levantada em outros estudos comparativos que avaliaram o padrão genômico (CGH cromossômico e CGH-*array*) e o perfil de expressão gênica (cDNA microarrays e qRT-PCR) em SPI e LMS (DERRÉ et al. 2001; CHIBON et al. 2003; LARRAMENDY et al. 2008).

KRESSE et al. (2010) compararam os perfis de ganhos e perdas genômicas de 33 SPI e 44 LMS obtidos pela análise de CGH-*array* (BAC e PAC arrays de 4.6 K) identificaram sete regiões cromossômicas (1p36.32-p35.2, 1p21.3-p21.1, 1q32.1-q42.13, 2q14.1-q22.2, 4q33-q34.3, 6p25.1-p21.32 e 7p22.3-p13) que apresentaram diferenças significativas do número de cópias entre as duas entidades. Entre as sete alterações identificadas pelos autores, três estavam presentes entre as regiões cromossômicas que diferenciavam os SPI dos LMS avaliados em nossa casuística (1p35.1-p36.32, 1q32.1-q42.13 e 7p22.3-p13).

Três *clusters* foram identificados pela análise de agrupamento hierárquico não supervisionado envolvendo as 37 amostras de SPI e LMS avaliadas. A análise não supervisionada dos casos referentes aos sítios anatômicos também não foi capaz de formar *clusters* únicos. O *cluster* 2 foi significativamente associado a pacientes que morreram em decorrência da doença ( $P = 0,022$ ). Foram detectadas 105 alterações

exclusivas para o *cluster 2* (mais de 50% dos casos) quando comparado aos demais *clusters*, incluindo os ganhos em 1q21.2, 1q21.3, 9q34.11, 11p15.5, 11q13.1, 16p13.3 e 20q13.33 que já foram descritos previamente neste estudo como alterações significativas na análise individual dos SPI e LMS.

Na análise de agrupamento, o *cluster 2* (13 casos) foi caracterizado por apresentar 7/13 amostras com diagnóstico complexo (SP1, SP2, SP6, SP7, SP8, SP19 e LMS20), dos quais cinco apresentaram características morfológicas que se sobrepõem entre SPI e LMS (SP2, SP7, SP8, SP19 e LMS20). Adicionalmente, outros dois casos classificados como SPI demonstraram áreas mixóides focais (SP1) e características de tecido adiposo (SP6). Na tentativa de verificar se ADC poderiam influenciar na segregação dos SPI em relação aos LMS na análise de agrupamentos, foi realizada uma segunda análise excluindo as ADCs; porém, as amostras de SPI se mantiveram agrupadas com os LMS.

Alterações envolvendo grandes segmentos genômicos, como as perdas em 5p, 10q, 13q e 17p, são eventos recorrentes em SPI e LMS que permitiram a identificação de uma série de marcadores moleculares com possível papel na progressão tumoral e na disseminação metastática, incluindo *PTEN*, *RBI*, *TP53*, *TRIO*, *CDKN2A* e *CCND1*, (MAIRAL et al. 1999; CHIBON et al. 2000; WANG et al. 2001; YANG et al. 2009; GIBault et al. 2010, 2012).

Em 34 amostras de sarcomas (incluindo seis SPI), ADAMOWICZ et al. (2006) avaliaram as alterações genômicas por CGH-*array*, usando uma plataforma com 418 BACs representativos do cromossomo 5. Os autores também avaliaram o padrão de expressão gênica por qRT-PCR. Os resultados demonstraram um aumento da expressão do gene *TRIO* correlacionado com aumento do número de cópias e

amplificações no braço curto do cromossomo 5 em todos os sarcoma avaliados. Considerando o papel importante do gene *TRIO* no controle do ciclo celular, na apoptose, migração e proliferação celular (DEBANT et al. 1996), os autores sugeriram que este gene também está associado a progressão em SPI. O aumento da expressão e a amplificação do gene *TRIO* também foi previamente relatado em alguns carcinomas, incluindo bexiga, pulmão de não pequenas células e cavidade oral (ZHENG et al. 2004; GARNIS et al. 2005). Os ganhos envolvendo o gene *TRIO* (5p15.2) foram detectados em nove amostras de SPI (dos quais três apresentavam amplificações) e em cinco LMS em nosso estudo, sugerindo que este gene também está envolvido na progressão de LMS.

Utilizando *CGH-array* e *cDNA* microarray, GIBAULT et al. (2010) realizaram uma análise integrada destes dados em 160 SPM. Análise não supervisionada dos dados de expressão gênica permitiu a identificação de cinco subgrupos tumorais, um deles composto por LMS bem diferenciados (grupo A) e os outros quatro formados por SPI, LMS pobremente diferenciados e outros tumores pleomórficos (B-D). A deleção do gene *PTEN* foi um evento recorrente nos grupos A, C e D. Em 2012, os mesmos autores avaliaram o perfil de expressão gênica dos genes *PTEN* e *RICTOR*, utilizando qRT-PCR, na série previamente avaliada por *CGH-array* e *cDNA* microarray. Os autores relataram diminuição significativa da expressão do gene *PTEN* em tumores que apresentavam deleções em 10q, especialmente em LMS bem diferenciados, sugerindo que este gene, assim como, de componentes de vias associadas (AKT/mTOR, por exemplo), pode ser importante para o desenvolvimento dos sarcomas, particularmente LMS.

No presente estudo, foram identificadas perdas em 10q23.3, especificamente onde o gene *PTEN* está mapeado, em sete casos de LMS e em 11 casos de SPI. A proteína PTEN atua como inibidora da via AKT/mTOR, que tem sido associada com proliferação celular e resistência a apoptose. A inibição de PTEN e ativação da via AKT/mTOR são eventos que tem sido frequentemente associados a tumorigênese, particularmente em sarcomas com cariótipo complexo, incluindo LMS (GIBAULT et al. 2012; GROSSMANN et al. 2012).

Para avaliar o papel do gene *PTEN* no desenvolvimento de LMS, HERNANDO et al. (2007) realizaram um ensaio de silenciamento por siRNA do gene *PTEN* em músculo liso normal de camundongos. A supressão condicional de *PTEN* resultou na ativação da via sinalização AKT, assim como, hiperplasia muscular e desenvolvimento de leiomiossarcomas. Este modelo animal forneceu evidências de que as células musculares lisas são extremamente sensíveis ao estado da função PTEN, sugerindo seu papel no desenvolvimento do tumor.

A perda em 13q tem sido associada com a inativação da via de sinalização do gene *RBI* e tem sido relatada como um evento precoce no desenvolvimento de SPI (MAIRAL et al. 1999; CHIBON et al. 2000; DERRÉ et al. 2001). A regulação da proteína Rb está associada à via de sinalização RB-ciclina D, onde CDK4 se liga a ciclina D formando um complexo que irá promover a fosforilação da proteína RB e liberação do fator de transcrição E2F para a progressão do ciclo celular (SHERR 1996). Em nosso estudo, foi verificada uma alta frequência de perdas em 13q14.2, onde está mapeado o gene *RBI*, envolvendo 55% e 65% dos casos de SPI e LMS, respectivamente.

A amplificação em 17p tem sido considerada um evento específico em LMS (PÉROT et al. 2009). No presente estudo, regiões de ampliações (aproximadamente 12 Mb) foram identificadas envolvendo 17p11.2-p13.1 em 3/5 casos de LMS que apresentaram ganho no número de cópias (LMS5, LMS17, LMS18, LMS20 e LMS22). O principal alvo desta região amplificada é o gene da miocardina (*MYOCD*), mapeado em 17p11.2. Em análise integrada de dados genômicos (*CGH-array* e FISH) e transcriptômicos de 19 SPI e 17 LMS, PÉROT et al. (2009) demonstraram que o gene da miocardina (*MYOCD*) se encontra altamente amplificado e expresso em LMS retroperitoneais. Em concordância com os dados descritos em literatura, todos os casos de LMS com amplificação deste gene em nosso estudo também estavam localizados no retroperitônio (LMS17, LMS18 e LMS22). Em adição, a presença de metástase a distância foi observada em um caso com amplificação (LMS18) e em dois casos (LMS5, e LMS20) que apresentaram ganhos do gene *MYOCD*. A proteína MYOCD é um cofator transcricional de SRF (fator de resposta sérica) que regula a diferenciação de músculo liso e pode estar envolvida nas altas taxas de metástase em LMS, uma vez que está fortemente associada com a habilidade de migração das células (WANG et al. 2003; PÉROT et al. 2009). Em estudo prévio da equipe avaliando o perfil de expressão em larga escala para as mesmas amostras de SPI e LMS (*CGH-array*), foi demonstrado um aumento da expressão do gene *MYOCD* em um subgrupo de LMS de retroperitônio, incluindo LMS17 e LMS22 que também estavam amplificados em nossa análise de *CGH-array*. Estes resultados sugerem que o desenvolvimento de LMS, particularmente na região retroperitoneal, depende da amplificação e aumento de

expressão de *MYOCD* como demonstrado por outros grupos (PÉROT et al. 2009; GIBAULT et al. 2010).

Adicionalmente, os ganhos envolvendo a região do gene *MYOCD* também foram detectados nas amostras de SPI (SP2, SP3, SP7, SP8, SP9, SP19 e SP22), embora nenhuma amplificação tenha sido observada. Dois casos estavam localizados no retroperitônio (SP2 e SP3) e quatro eram amostras que apresentam um diagnóstico complexo (ADC), caracterizadas por áreas contendo feixes de músculo lisos pobremente diferenciados (SP2, SP7, SP8 e SP19). Na análise de agrupamentos, as amostras que apresentaram ganhos do gene da miocardina não apresentaram um perfil específico quanto à localização ou a presença de ACD; apenas os LMS de retroperitônio se agruparam no *cluster1*.

O gene supressor tumoral *TP53* está mapeado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1). Deleções ou/e mutações neste gene foram descritas em sarcomas de partes moles (YOO et al. 1997; SANDBERG 2005; PÉROT et al. 2010). O perfil de alterações genômicas envolvendo este gene *TP53* foi bastante heterogêneo na série de sarcomas. Nos SPI foram observados tanto ganhos (SP2, SP4, SP7 e SP8) quanto perdas genômicas (SP18, SP21 e SP22), enquanto nos LMS as perdas foram mais recorrentes, sendo detectadas em oito casos (LMS15, LMS16, LMS17, LMS18, LMS20, LMS21, LMS22 e LMS24).

PÉROT et al. (2010) utilizaram as técnicas de CGH-*array*, sequenciamento e expressão gênica para avaliar o estado dos genes *TP53*, *CDKN2A* e *CDKN2B* em uma série de 34 LMS e 109 SPI. Os autores relataram que deleções e mutações foram mais frequentes em LMS, corroborando com os resultados aqui detectados. Os autores demonstraram a inativação bialélica do *TP53* foi observada em 50% dos

LMS, enquanto a maioria dos SPI mantinha um alelo selvagem (87,2%). Em adição, também foi observado que 20% dos LMS e 29% dos SPI não apresentaram mutações neste gene; porém nestes tumores sem mutação no *TP53* foram detectadas deleções ou inibição de *CDKN2A* e *CDKN2B*, sugerindo um genótipo alternativo à inativação do gene *TP53*.

A susceptibilidade genética é um fator de risco para o desenvolvimento de sarcomas, particularmente em pacientes com doenças hereditárias como na Síndrome de Li-Fraumeni, a qual o gene *TP53* tem sido consistentemente associado (MALKIN et al. 1990). Uma paciente de 74 anos foi caracterizada como portadora da Síndrome de Li-Fraumeni (LMS22) em nossa casuística, onde foi observado perda em 17p13.1. OGNJANOVIC et al. (2012) realizaram uma revisão dos principais sarcomas em portadores de mutações no gene *TP53* (*IARC TP53 Database*). O estudo revelou que mutações neste gene (sem sentido, sítios de splice ou *frameshift*) e mutações fora do domínio de ligação ao DNA estão associadas com um fenótipo menos severo em leiomiossarcomas. Com relação aos oito casos que apresentaram perdas do gene *TP53* em nossa casuística, apenas três exibiram um fenótipo mais agressivo como desenvolvimento de metástase a distância (LMS18 e LMS20) e recorrência local (LMS6 e LMS8).

A análise do perfil de alterações genômicas detectado pela metodologia de CGH-*array* revelou regiões genômicas, que variaram de 100 Kb até 4 Mb, com um padrão significativo de alterações no número de cópias de DNA em SPI e LMS. Com o intuito de explorar mais precisamente estas alterações, foram selecionados alguns genes mapeados nestas regiões, particularmente em 1q21-q22 (*ARNT*, *PXIP1* e *SCL27A3*) e 11q13.1 (*CCND1*). A seleção dos genes alvo baseou-se em uma análise

comparando os dados genômicos e de expressão gênica global (dados não mostrados) em que se observou uma correlação positiva entre ganhos genômicos e a aumento expressão de vários genes mapeados em regiões genômicas de ganhos que foram significativas para SPI e LMS. Entre estes genes que apresentaram concomitante ganhos e aumento expressão, verificou-se que as sondas representativas dos genes *ARNT*, *PXIP1* e *SCL27A3* estavam distribuídas ao longo do amplicon 1q21.1-q22 (4.12 Mb) que foi frequentemente encontrado em SPI e LMS. O gene *CCND1* foi selecionado devido sua frequência e o papel descrito em LMS, contudo, não foram observadas alterações significantes neste gene em nossa série de tumores avaliados pela qPCR.

A metodologia de PCR quantitativa em tempo real foi utilizada para a avaliação do número de cópias do DNA em um subgrupo de SPI e LMS previamente avaliados por *CGH-array*. Deste modo, oito pares de iniciadores foram desenhados cobrindo a mesma sequência detectada por sondas presentes na plataforma de *CGH-array*, bem como em outras regiões próximas para determinar a extensão das alterações.

Na análise de *CGH-array*, oito casos apresentaram ganhos envolvendo gene *ARNT* (SP1, SP3, SP7, SP8, SP9, SP16, SP19 e SP23) e um caso tinha amplificação (caso SP7). Ganhos na região do gene *PBXIP1* foram detectados em nove casos (SP1, SP3, SP7, SP8, SP9, SP16, SP17, SP20 e SP23), assim como, para o gene *SLC27A3* (SP1, SP3, SP7, SP8, SP9, SP16, SP19, SP20 e SP23). Dois casos apresentaram amplificação envolvendo os genes *PBXIP1* e *SLC27A3* (SP7 e SP8). Quando estes três genes foram avaliados pela qPCR, verificou-se um resultado semelhante ao observado na análise de *CGH-array*. No entanto, a correlação entre os

dados obtidos pela análise em larga escala e os resultados da qPCR para estes genes específicos não foi significativa no subgrupo de casos avaliados. Os casos SP7 e SP9 apresentaram ganhos de todos os marcadores (*ARNT\_P1*, *ARNT\_P2*, *ARNT\_P3*, *PBXIP1\_P1*, *PBXIP1\_P2* e *SLC27A3\_P1*) representativos dos genes *ARNT*, *PBXIP1* e *SLC27A3*, sendo que um alto nível de ganhos foi observado em um caso (SP9). Interessantemente, este padrão de ganhos envolvendo os três genes não foi detectado em nenhuma amostra de LMS, sugerindo que este seja um marcador específico para SPI ou um evento mais específico para células indiferenciadas como o padrão observado em SPI.

Vários estudos demonstraram um alto nível de amplificação na região 1q21-q22 em sarcomas pleomórficos indiferenciados e em uma variedade de outros sarcomas, incluindo lipossarcomas e osteossarcomas (LARRAMENDY et al. 1997; FORUS et al. 1998; MAIRAL et al. 1999; WENG et al. 2003; TAKKANEN et al. 2006; KRESSE et al. 2010; LOUIS-BRENNETOT et al. 2011). Como já descrito previamente, apenas um estudo em literatura avaliou possíveis genes alvos no amplicon 1q21-q22 (*FLG*, *IVL*, *SPRR3*, *SPRR1B*, *SPRR2A*, *MUC1*, *S100A6* e *S100A2*); porém poucas amostras representativas de SPI (quatro casos) e LMS (três casos) foram avaliadas.

O receptor aril-hidrocarboneto (do inglês; AHR - *aryl hydrocarbon receptor*) e o transportador nuclear para o receptor aril-hidrocarboneto (ARNT), também conhecido como fator induzido por hipóxia beta 1 (HIF-1b), formam o complexo indutor-AHR/ARNT que apresenta importante papel na carcinogênese e na regulação da transcrição do gene *Cytochrome P4501A1* (*CYP1A1*) e de genes associados ao metabolismo de xenobióticos (LABRECQUE et al. 2012). Embora, o gene *ARNT*

seja constitutivamente expresso em tecidos humanos, um aumento da expressão deste gene foi observado em células normais de ovário, pulmão, baço, testículos e pâncreas (YAMAMOTO et al. 2004). Dois estudos recentes demonstraram que a expressão do gene *ARNT* pode ser regulada pelos microRNAs, onde *miR-107* e *miR-24* poderiam regular negativamente a expressão deste gene em tecido hepático humano e em linhagens de carcinoma de colón, respectivamente (YAMAKUCHI et al. 2010; ODA et al. 2012). Coincidentemente, em quatro casos de SPI que apresentaram perda de *miR-107* (SP7, SP20, SP21 e SP23) também foi observado um aumento do número de cópias do gene *ARNT* por qPCR. Dessa forma, uma avaliação da expressão do *miR-107* e do gene *ARNT* neste subconjunto de SPI deve ser realizada para confirmação de um possível mecanismo de regulação da expressão do gene *ARNT* por este microRNA em SPI.

Na série de sarcomas avaliados neste estudo, 63% dos 16 casos de SPI exibiram um aumento do número de cópias do gene *ARNT* pela análise qPCR, particularmente na região dos marcadores *ARNT\_P2* e *ARNT\_P3* localizados nos éxons 14 e 8, respectivamente. O aumento do número de cópias do gene *ARNT* observado em um subconjunto de SPI, particularmente em regiões exônicas, sugere que este mecanismo possa desempenhar ter um papel importante na regulação da transcrição e, conseqüentemente, na quantidade de produto deste gene *ARNT* influenciando no fenótipo dos sarcomas pleomórficos indiferenciados.

Os ganhos envolvendo os genes *SLC27A3* e *PBXIP1* também foram recorrentes em SPI (38% dos casos cada). O gene *SLC27A3/ACSVL3*, responsável por codificar a enzima Acetil-CoA sintetase que está localizada na membrana plasmática e mitocondrial, é associada ao metabolismo de ácidos graxos

particularmente em células neoplásicas (PEI et al. 2009). A contribuição das vias metabólicas de lipídios para o desenvolvimento neoplásico é pouco compreendida. Entretanto, sabe-se que uma alta taxa de síntese lipídica é necessária para realizar a biogênese da membrana plasmática necessária para o crescimento do tumor (PATRA 2008). Os lipídios desempenham funções importantes como segundos mensageiros em vias que estão desreguladas em células tumorais e, portanto, a elevação destes mensageiros lipídicos específicos está muitas vezes associada com o fenótipo maligno (KUHAJDA et al. 1994; PEI et al. 2004). Possivelmente, o gene *SLC27A3* possa atuar mediando o metabolismo de ácidos graxos em SPI, uma vez que, estes tumores apresentam uma taxa proliferativa elevada e, portanto, um aumento da demanda de ácido graxo deve ser requerida para crescimento destes tumores. Estudos funcionais demonstraram que o gene *SLC27A3* é um importante alvo terapêutico em gliomas, uma vez que mantém as propriedades oncogênicas em linhagens celulares de glioma por mecanismos que regulam a proteína AKT (PEI et al. 2009).

A função do gene *PBXIP1/HPIP*, não foi completamente elucidada, porém tem sido descrita sua participação na regulação de genes-alvo para o ER-alfa através da ativação das vias MAPK e AKT em câncer de mama (WANG et al. 2008). Em literatura, os estudos demonstram que os genes *PBXIP1* e *SLC27A3* estão associados ao mecanismo de regulação de crescimento das células tumorais, particularmente, pela via de sinalização AKT (WANG et al. 2008; PEI et al. 2009). Em recente estudo usando imunistoquímica para os componentes da via AKT (PTEN, mTOR e AKT), SETSU et al. (2012) encontram uma associação significativa entre o estado fosforilado das proteínas mTOR e AKT com progressão tumoral e pior prognóstico em leiomiossarcomas, demonstrando que a via AKT está ativada nestes tumores e

pode contribuir com fenótipo mais agressivo. Em adição, ensaios pré-clínicos para doxorubicina e inibidores da via das proteínas AKT/PI3K (como AKT1, AKT2, PI3K e mTOR) demonstraram respostas positivas em sarcomas pleomórficos indiferenciados (JUDSON 2010; KIM et al. 2012). Dessa forma, o aumento do número de cópias para dos genes *PBXIP1* e *SLC27A*, assim como, a perda observada para o gene *PTEN*, sugerem que a via AKT pode estar alterada em nossa casuística, sendo necessárias etapas de validação para avaliar a expressão destes genes nestes tumores.

A variabilidade clínica observada nos subtipos de sarcomas está provavelmente relacionada com a diversidade em cada etapa da oncogênese, assim como com a diversidade relacionada ao microambiente tumoral. Várias células distintas de origem mesenquimal podem ser alvos para transformação maligna em sarcomas e este processo será dirigido de acordo com a ativação de vias genéticas específicas envolvidas com a tumorigênese (PENNACCHIOLI et al. 2012).

No presente estudo foram avaliadas as principais alterações envolvidas no aumento e diminuição do número de cópias genômicas em uma série de 20 sarcomas pleomórficos indiferenciados e 17 leiomiossarcomas, assim como, os genes mapeados nestas regiões que podem influenciar no fenótipo destes pacientes. Entre os potenciais genes descritos neste estudo destacam-se genes já descritos em literatura como associados aos sarcomas, incluindo supressores tumorais (*CDKN2A*, *RB1*, *PTEN* e *TP53*) e oncogenes (*S100A4*, *TRIO*, *MUC1*, *CCND1* e *MYOCD*). Em adição, genes que não foram descritos previamente como importantes no desenvolvimento de SPI e LMS, foram aqui relatados, incluindo *ARNT*, *PXIP1* e *SCL27A3*.

Outra abordagem empregada neste estudo foi comparar os dados clínicos dos dois grupos tumorais com as alterações genômicas, onde se observou regiões genômicas associadas significativamente a redução da sobrevida global nestes pacientes, incluindo as perdas em 1q21.1-q21.2 para SPI, assim como, os ganhos em 1q21.3, 6p21.32, 11q12.2-q12.3, 16p11.2, 19q13.12 e 19q13.43 para LMS. Outras regiões também foram significantes para predizer pior prognóstico (desenvolvimento de metástase, presença de recorrência e morte) para os SPI (perdas em 18q11.32) e para LMS (ganhos em 1q21.3, 11q12.2-q12.3, 16p11.2, 17q25.1, 19q13.12 e 19q13.43 e as perdas em 16p11.2). Adicionalmente, três genes mapeados no *amplicon* 1q21-q22 foram validados quanto a avaliação do número de cópias pela qPCR, revelando possíveis marcadores em SPI.

Nas principais regiões genômicas alteradas identificadas em SPI foram observados genes que atuam em processos importantes da carcinogênese, particularmente evasão do apoptose, angiogênese e motilidade celular. Genes que regulam o processo de duplicação do DNA e a transcrição gênica também foram frequentemente observados nestas regiões, possivelmente devido à exacerbada atividade proliferativa das células tumorais. Em leiomiiossarcomas foi verificado um predomínio de genes com funções de progressão e diferenciação celular, miogênese, transcrição gênica e resposta imunológica, assim como, alguns microRNAs (*miR133* e *miR107*) já descritos como importantes reguladores em LMS. Dessa forma, estes genes merecem uma análise mais detalhada por estudos funcionais e de expressão genica para permitir a identificação de marcadores prognósticos em SPI e LMS.

O delineamento do perfil genômico de acordo com as características clínicas e patológicas em cada paciente permitiu a identificação de nove regiões cromossômicas significativamente alteradas associadas à características de pior prognóstico e sobrevida reduzida nestes tumores, assim como, observou-se a

formação de um subgrupo de SPI e LMS com características de pior prognóstico. Em conjunto, estes perfis de alterações genômicas podem contribuir para a estratificação destes pacientes, revelando novos marcadores moleculares que possam ser efetivos para classificação e diagnóstico de sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiossarcomas.

## 7 CONCLUSÕES

- O delineamento do perfil de alterações no número de cópias do DNA de acordo com as características clinicopatológicas em cada paciente permitiu a identificação de doze regiões cromossômicas significativamente alteradas em sarcomas pleomórficos indiferenciados e leiomiiossarcomas. A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado baseada nas alterações envolvidas em ganhos e perdas não foi capaz de diferenciar os dois tipos tumorais;
- Nas regiões mínimas recorrentes foram descritos vários genes que atuam em processos importantes da carcinogênese como regulação da transcrição e do ciclo celular, remodelamento da cromatina, evasão do apoptose, angiogênese e motilidade celular. Dentre estas regiões, foram confirmadas as alterações genômicas detectadas em 1q21-q22 onde se mapeiam os genes *ARNT*, *PBXIP1* e *SLC27A3*, revelando seu envolvimento comum aos dois tipos tumorais.
- As regiões genômicas significantes em SPI e LMS foram associadas às características de pior prognóstico (desenvolvimento de metástase, presença de recorrência local e morte pela doença nestes pacientes) e sobrevida reduzida.
- A análise multivariada revelou que ganhos em 1q21.3 foram significativamente associados com risco de morte pela doença em pacientes com leiomiiossarcomas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamowicz M, Radlwimmer B, Rieker RJ, et al. Frequent amplifications and abundant expression of TRIO, NKD2, and IRX2 in soft tissue sarcomas. **Genes Chromosomes Cancer** 2006; 45:829-38.

Aguiar Junior S, Ferreira FO, Rossi BM, et al. Neoadjuvant chemoradiation therapy for soft tissue sarcomas of the extremities. **Clinics (Sao Paulo)** 2009; 64:1059-64.

Almal SH, Padh H. Implications of gene copy-number variation in health and diseases. **J Hum Genet** 2012; 57:6-13.

Armengol G, Tarkkanen M, Virolainen M, et al. Recurrent gains of Iq8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridisation. **Br J Cancer** 1997; 75:1403-9.

Baird K, Davis S, Antonescu CR, et al. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. **Cancer Res** 2005; 65:9226-35.

Barretina J, Taylor BS, Banerji S, et al. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. **Nat Genet** 2010; 42:715-21.

Beck AH, Lee CH, Witten DM, et al. Discovery of molecular subtypes in leiomyosarcoma through integrative molecular profiling. **Oncogene** 2010; 29:845-54.

Benjamin RS, Debiec-Rychter M, Le Cesne A, et al. Gastrointestinal stromal tumors II: Medical oncology and tumor response assessment. **Semin Oncol** 2009; 36:302-11.

Blay JY, Le Cesne A. Adjuvant chemotherapy in localized soft tissue sarcomas: still not proven. **Oncologist** 2009; 14:1013-20.

Borden EC, Baker LH, Bell RS, et al. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. **Clin Cancer Res** 2003; 9:1941-56.

Boye K, Maelandsmo GM. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. **Am J Pathol** 2010; 176:528-35.

Canter RJ, Beal S, Borys D, et al. Interaction of histologic subtype and histologic grade in predicting survival for soft-tissue sarcomas. **J Am Coll Surg** 2010; 210:191-8.e2.

Carneiro A, Francis P, Bendahl PO, et al. Indistinguishable genomic profiles and shared prognostic markers in undifferentiated pleomorphic sarcoma and leiomyosarcoma: different sides of a single coin? **Lab Invest** 2009; 89:668-75.

Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nat Genet** 2006; 38:228-33.

Chibon F, Mairal A, Fréneaux P, et al. The RB1 gene is the target of chromosome 13 deletions in malignant fibrous histiocytoma. **Cancer Res** 2000; 60:6339-45.

Chibon F, Mariani O, Mairal A, et al. The use of clustering software for the classification of comparative genomic hybridization data. an analysis of 109 malignant fibrous histiocytomas. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 141:75-8.

Chibon F, Lagarde P, Salas S, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. **Nat Med** 2010; 16:781-7.

Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM. Soft-tissue sarcomas in adults. **N Engl J Med** 2005; 353:701-11.

Coindre JM, Terrier P, Bui NB, et al. Prognostic factors in adult patients with locally controlled soft tissue sarcoma. A study of 546 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. **J Clin Oncol** 1996; 14:869-77.

Coindre JM, Terrier P, Guillou L, et al. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. **Cancer** 2001; 91:1914-26.

Coindre JM, Hostein I, Maire J, et al. Inflammatory malignant fibrous histiocytomas and dedifferentiated liposarcomas: histological review, genomic profile, and MDM2 and CDK4 status favour a single entity. **J Pathol** 2004; 203:822-30.

Coindre JM. Grading of soft tissue sarcomas: review and update. **Arch Pathol Lab Med** 2006; 130:1448-53.

Costa J, Wesley RA, Glatstein E, Rosenberg SA. The grading of soft tissue sarcomas: results of clinicohistopathologic correlation in a series of 163 cases. **Cancer** 1984; 53:530-41.

Curtis LJ, Li Y, Gerbault-Seureau M, et al. Amplification of DNA sequences from chromosome 19q13.1 in human pancreatic cell lines. **Genomics** 1998; 53:42-55.

Debant A, Serra-Pages C, Seipel K, et al. The multidomain protein trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:5466-71.

Dei Tos AP. Classification of pleomorphic sarcomas: where are we now? **Histopathology** 2006; 48:51-62.

Demetri GD, Antonia S, Benjamin RS, et al. National comprehensive cancer network soft tissue sarcoma panel. soft tissue sarcoma. **J Natl Compr Cancer Netw** 2010; 8:630-74.

Demicco EG, Lazar AJ. Clinicopathologic considerations: how can we fine tune our approach to sarcoma? **Semin Oncol** 2011; 38(Suppl 3):S3-18.

Derré J, Lagacé R, Nicolas A, et al. Leiomyosarcomas and most malignant fibrous histiocytomas share very similar comparative genomic hybridization imbalances: an analysis of a series of 27 leiomyosarcomas. **Lab Invest** 2001; 81:211-5.

Deyrup AT, Lee VK, Hill CE, et al. Epstein–Barr virus associated smooth muscle tumors are distinctive mesenchymal tumors reflecting multiple infection events: a clinicopathologic and molecular analysis of 29 tumors from 19 patients. **Am J Surg Pathol** 2006; 30:75-82.

Diskin SJ, Eck T, Greshock J, et al. STAC: A method for testing the significance of DNA copy number aberrations across multiple array- experiments. **Genome Res** 2006; 16:1149-58.

Ducimetiere F, Lurkin A, Ranchère-Vince D, et al. Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. **PLoS One** 2011; 6:e20294.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti. **AJCC cancer staging manual**. 7<sup>a</sup> ed. New York: Springer-Verlag, 2010. Soft tissue sarcoma; p.291-8.

El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Knuutila S, Miettinen M. DNA copy number changes in development and progression in leiomyosarcomas of soft tissues. **Am J Pathol** 1998; 153:985-90.

Eriksson M. Histology-driven chemotherapy of soft-tissue sarcoma. **Ann Oncol** 2010; 21:270-6.

Espinosa I, Beck AH, Lee CH, et al. Coordinate expression of colony-stimulating factor-1 and colony-stimulating factor-1-related proteins is associated with poor prognosis in gynecological and nongynecological leiomyosarcoma. **Am J Pathol** 2009; 174:2347-56.

Espinosa I, Edris B, Lee CH, et al. CSF1 expression in nongynecological leiomyosarcoma is associated with increased tumor angiogenesis. **Am J Pathol** 2011; 179:2100-7.

Estivill X, Armengol L. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. **PLoS Genet** 2007; 3:1787-99.

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. **Nat Rev Genet** 2006; 7:85-97.

Fletcher CDM. Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: fact or fiction? A critical reappraisal based on 159 tumors diagnosed as pleomorphic sarcoma. **Am J Surg Pathol** 1992; 16:213-28.

Fletcher CDM, Dal Cin P, De Wever I, et al. Correlation between clinicopathologic features and karyotype in spindle cell sarcomas. A report of 130 cases from the CHAMP Study Group. **Am J Pathol** 1999; 154:1841-7.

Fletcher CDM, Gustafson P, Rydholm A, et al. Clinicopathologic re-evaluation of 100 malignant fibrous histiocytomas: Prognostic relevance of subclassification. **J Clin Oncol** 2001; 12:3045-50.

Fletcher CDM, van den Berg E, Molenaar W. Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma/Undifferentiated high grade pleomorphic sarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. **Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press; 2002. p.120-2. (IARC WHO Classification of Tumours).

Fletcher CDM. The evolving classification of soft tissue tumours: an update based on the new WHO classification. **Histopathology** 2006; 48:3-12.

Forus A, Florenes VA, Maelandsmo GM, et al. Mapping of amplification units in the q13–q14 region of chromosome 12 in human sarcomas: some amplicons do not include MDM2. **Cell Growth Differ** 1993; 4:1065-70.

Forus A, Weghuis DO, Smeets D, et al. 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** 1995; 14:8-14.

Forus A, Berner JM, Meza-Zepeda LA, et al. Molecular characterization of a novel amplicon at 1q21-q22 frequently observed in human sarcomas. **Br J Cancer** 1998; 78:495-503.

Francis P, Namløs HM, Müller C, et al. Diagnostic and prognostic gene expression signatures in 177 soft tissue sarcomas: hypoxia-induced transcription profile signifies metastatic potential. **BMC Genomics** 2007; 8:73.

Fujiwara M, Kashima TG, Kunita A, et al. Stable knockdown of S100A4 suppresses cell migration and metastasis of osteosarcoma. **Tumour Biol** 2011; 32:611-22.

Ganjoo K, Jacobs C. Antiangiogenesis agents in the treatment of soft tissue sarcomas. **Cancer** 2010; 116:1177-83.

Garnis C, Davies JJ, Buys TP, et al. Chromosome 5p aberrations are early events in lung cancer: Implication of glial cell line-derived neurotrophic factor in disease progression. **Oncogene** 2005; 24:4806-12.

Gibault L, Pérot G, Chibon F, et al. New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. **J Pathol** 2010; 223:64-71.

Gibault L, Ferreira C, Pérot G, et al. From PTEN loss of expression to RICTOR role in smooth muscle differentiation: complex involvement of the mTOR pathway in leiomyosarcomas and pleomorphic sarcomas. **Mod Pathol** 2012; 25:197-211.

Grossmann AH, Layfield LJ, Randall RL. Classification, molecular characterization, and the significance of pten alteration in leiomyosarcoma. **Sarcoma** 2012; 2012:380896.

Guillou L, Coindre JM, Bonichon F, et al. Comparative study of the National Cancer Institute and French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group grading systems in a population of 410 adult patients with soft tissue sarcoma. **J Clin Oncol** 1997; 15:350-62.

Guillou L, Aurias A. Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. **Virchows Arch** 2010; 456:201-17.

Hallor KH, Sciort R, Staaf J, et al. Two genetic pathways, t(1;10) and amplification of 3p11-12, in myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, haemosiderotic fibrolipomatous tumour, and morphologically similar lesions. **J Pathol** 2009; 217:716-27.

Hasegawa T, Hasegawa F, Hirose T, et al. Expression of smooth muscle markers in so called malignant fibrous histiocytomas. **J Clin Pathol** 2003; 56:666-71.

Henderson SR, Guiliano D, Presneau N, et al. A molecular map of mesenchymal tumors. **Genome Biol** 2005; 6:R76.

Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, et al. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. **Nat Med** 2007; 13:748-53.

Hisaoka M, Tsuji S, Hashimoto H, et al. Dedifferentiated liposarcoma with an inflammatory malignant fibrous histiocytoma-like component presenting a leukemoid reaction. **Pathol Int** 1997; 47:642-6.

Hollowood K, Fletcher CD. Malignant fibrous histiocytoma: morphologic pattern or pathologic entity? **Semin Diagn Pathol** 1995; 12:210-20.

Hu J, Khanna V, Jones M, Surti U. Genomic alterations in uterine leiomyosarcomas: potential markers for clinical diagnosis and prognosis. **Gen Chrom Cancer** 2001; 31:117-24.

Hu J, Rao UN, Jasani S, Khanna V, Yaw K, Surti U. Loss of DNA copy number of 10q is associated with aggressive behavior of leiomyosarcomas: a comparative genomic hybridization study. **Cancer Genet Cytogenet** 2005; 161:20-7.

Idbaih A, Coindre JM, Derré J, et al. Myxoid malignant fibrous histiocytoma and pleomorphic liposarcoma share very similar genomic imbalances. **Lab Invest** 2005; 85:176-81.

Ito M, Barys L, O'Reilly T, et al. Comprehensive mapping of p53 pathway alterations reveals an apparent role for both SNP309 and MDM2 amplification in sarcomagenesis. **Clin Cancer Res** 2011; 17:416-26.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:277-300.

Judson I. Targeted therapies in soft tissue sarcomas. **Ann Oncol** 2010; 21(Suppl 7):vii277-80.

Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, et al. Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. **J Pathol** 2003; 201:487-95.

Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, et al. Death-associated protein kinase (DAP kinase) alteration in soft tissue leiomyosarcoma: promoter methylation or homozygous deletion is associated with a loss of DAP kinase expression. **Hum Pathol** 2004; 35:1266-71.

Kempson RL, Kyriakos M: Fibroxanthoma of the soft tissues. A type of malignant fibrous histiocytoma. **Cancer** 1972; 29:961-76.

Kim S, Dodd RD, Mito JK, et al. Efficacy of phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors in a primary mouse model of undifferentiated pleomorphic sarcoma. **Sarcoma** 2012; 2012:680708.

Konomoto T, Fukuda T, Hayashi K, Kumazawa J, Tsuneyoshi M. Leyomiosarcoma in soft tissue: examination of p53 status and cell proliferating factors in different locations. **Human Pathol** 1998; 29:74-81.

Konstantinopoulos PA, Fountzilias E, Goldsmith JD, et al. Analysis of multiple sarcoma expression datasets: implications for classification, oncogenic pathway activation and chemotherapy resistance. **PLoS One** 2010; 5:e9747.

Kresse SH, Ohnstad HO, Bjerkehagen B, et al. DNA copy number changes in human malignant fibrous histiocytomas by array comparative genomic hybridisation. **PLoS One** 2010; 5:e15378.

Kuhajda FP, Jenner K, Wood FD, et al. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:6379-83.

Labrecque MP, Takhar MK, Hollingshead BD, Prefontaine GG, Perdew GH, Beischlag TV. Distinct roles for aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator and ah receptor in estrogen-mediated signaling in human cancer cell lines. **PLoS One** 2012; 7:e29545.

Lahat G, Dhuka AR, Lahat S, et al. Complete soft tissue sarcoma resection is a viable treatment option for select elderly patients. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:2579-86.

Lahat G, Zhang P, Zhu QS, et al. The expression of c-Met pathway components in unclassified pleomorphic sarcoma/ malignant fibrous histiocytoma (UPS/MFH): a tissue microarray study. **Histopathology** 2011; 59:556-61.

Larramendy ML, Tarkkanen M, Blomqvist C, et al. Comparative genomic hybridization of malignant fibrous histiocytoma reveals a novel prognostic marker. **Am J Pathol** 1997; 151:1153-61.

Larramendy ML, Kaur S, Svarvar C, Böhling T, Knuutila S. Gene copy number profiling of soft-tissue leiomyosarcomas by array-comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet** 2006; 169:94-101.

Larramendy ML, Gentile M, Soloneski S, Knuutila S, Böhling T. Does comparative genomic hybridization reveal distinct differences in DNA copy number sequence patterns between leiomyosarcoma and malignant fibrous histiocytoma? **Cancer Genet Cytogenet** 2008; 187:1-11.

Lee CH, Espinosa I, Vrijaldenhoven S, et al. Prognostic significance of macrophage infiltration in leiomyosarcomas. **Clin Cancer Res** 2008, 14:1423-30.

Lee YF, John M, Edwards S, et al. Molecular classification of synovial sarcomas, leiomyosarcomas and malignant fibrous histiocytomas by gene expression profiling. **Br J Cancer** 2003; 88:510-5.

Lehnhardt M, Daigeler A, Homann HH, et al. MFH revisited: outcome after surgical treatment of undifferentiated pleomorphic or not otherwise specified (NOS) sarcomas of the extremities – an analysis of 140 patients. **Langenbecks Arch Surg** 2009; 394:313-20.

Lemm D, Mugge LO, Mentzel T, et al: Current treatment options in dermatofibrosarcoma protuberans. **J Cancer Res Clin Oncol** 2009;135:653-65.

Levy B, Mukherjee T, Hirschhorn K. Molecular cytogenetic analysis of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 121:1-8.

Liu SL, Han Y, Zhang Y, et al. Expression of metastasis-associated protein 2 (MTA2) might predict proliferation in non-small cell lung cancer. **Target Oncol** 2012; 7:135-43.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** 2001; 25:402-8.

Louis-Brennetot C, Coindre JM, Ferreira C, Pérot G, Terrier P, Aurias A. The CDKN2A/CDKN2B/CDK4/CCND1 pathway is pivotal in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma oncogenesis: an analysis of 104 tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 2011; 50:896-907.

Luo J, Su F, Chen D, et al. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. **Nature** 2000; 408:377-81.

Luo X, Sharff KA, Chen J, He TC, Luu HH. S100A6 expression and function in human osteosarcoma. **Clin Orthop Relat Res** 2008; 466:2060-70.

Lupski JR. Structural variation in the human genome. **N Engl J Med** 2007; 356:1169-71.

Maeda T, Hashitani S, Zushi Y, et al. Establishment of a nude mouse transplan-table model of a human malignant fibrous histiocytoma of the mandible with high metastatic potential to the lung. **J Cancer Res Clin Oncol** 2008; 134:1005-11.

Maelandsmo GM, Berner JM, Florenes VA, et al. Homozygous deletion of the CDKN2 gene in human sarcomas: relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. **Br J Cancer** 1995; 72:393-8.

Mahalingam D, Mita A, Sankhala K, et al. Targeting sarcomas: novel biological agents and future perspectives. **Curr Drug Targets** 2009; 10:937-49.

Mairal A, Terrier P, Chibon F, Sastre X, Lecesne A, Aurias A. Loss of chromosome 13 is the most frequent genomic imbalance in malignant fibrous histiocytomas. A comparative genomic hybridization analysis of a series of 30 cases. **Cancer Genet Cytogenet** 1999; 111:134-8.

Mairal A, Chibon F, Rousselet A, Couturier J, Terrier P, Aurias A. Establishment of a human malignant fibrous histiocytoma cell line, COMA. Characterization By conventional cytogenetics, comparative genomic hybridization, and multiplex fluorescence In situ hybridization. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 121:117-23.

Malfettone A, Silvestris N, Paradiso A, et al. Overexpression of nuclear NHERF1 in advanced colorectal cancer: association with hypoxic microenvironment and tumor invasive phenotype. **Exp Mol Pathol** 2012; 92:296-303.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Manavathi B, Singh K, Kumar R. MTA family of coregulators in nuclear receptor biology and pathology. **Nucl Recept Signal** 2007; 5:e010.

Mangia A, Malfettone A, Saponaro C, et al. Human epidermal growth factor receptor 2, Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 1 and breast cancer susceptibility gene-1 as new biomarkers for familial breast cancers. **Hum Pathol** 2011; 42:1589-95.

Matushansky I, Hernando E, Socci ND, et al. Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. **J Clin Invest** 2007; 117:3248-57.

Mertens F, Fletcher CD, Dal Cin P, et al. Cytogenetic analysis of 46 pleomorphic soft tissue sarcomas and correlation with morphologic and clinical features: a report of the CHAMP Study Group. **Chromos Morphology Genes Chromos Can** 1998; 22:16-25.

Miettinen M, Fetsch JF Evaluation of biological potential of smooth muscle tumours. **Histopathology** 2006; 48:97-105.

Mills AM, Beck AH, Montgomery KD, et al. Expression of subtype-specific group 1 leiomyosarcoma markers in a wide variety of sarcomas by gene expression analysis and immunohistochemistry. **Am J Surg Pathol** 2011; 35:583-9.

Mitelman F. **Mitelman database of chromosome aberrations in cancer**. Available from: <URL:<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>> [2010 dez 12].

Muleris M, Almeida A, Gerbault-Seureau M, Malfoy B, Dutrillaux B. Identification of amplified DNA sequences in breast cancer and their organization within homogeneously staining regions. **Genes Chromosomes Cancer** 1995; 14:155-63.

Myllykangas S, Knuutila S. Manifestation, mechanisms and mysteries of gene amplifications. **Cancer Lett** 2006; 232:79-89.

Nakayama R, Nemoto T, Takahashi H, et al. Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocytoma. **Mod Pathol** 2007; 20:749-59.

Nascimento AF, Raut CP. Diagnosis and management of pleomorphic sarcomas (So-Called “MFH”) in adults. **J Surg Oncol** 2008; 97:330-9.

Nielsen GP, Burns KL, Rosenberg AE, Louis DN. CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcoma that lack RB alterations. **Am J Pathol** 1998; 153:159-63.

Nielsen TO, West RB, Linn SC, et al. Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. **Lancet** 2002; 359:1301-7.

Nielsen TO, West RB. Translating gene expression into clinical care: sarcomas as a paradigm. **J Clin Oncol** 2010; 28:1796-805.

Nishio J, Iwasaki H, Ishiguro M, et al. Establishment of a new human malignant fibrous histiocytoma cell line, FU-MFH-1: cytogenetic characterization by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 144:44-51.

O'brien JE, Stout AP. Malignant fibrous xanthomas. **Cancer** 1964; 17:1445-55.

Oda Y, Nakajima M, Mohri T, et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in human liver is regulated by miR-24. **Toxicol Appl Pharmacol** 2012; 1:260:222-31.

Ognjanovic S, Olivier M, Bergemann TL, Hainaut P. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. **Cancer** 2012; 118:1387-96.

Osuna D, de Alava E. Molecular pathology of sarcomas. **Rev Recent Clin Trials** 2009; 4:12-26.

Otaño-Joos M, Mechtersheimer G, Ohl S, et al. Detection of chromosomal imbalances in leiomyosarcoma by comparative genomic hybridization and interphase cytogenetics. **Cytogenet Cell Genet** 2000; 90:86-92.

Ozzello L, Stout AP, Murray MR. Cultural characteristics of malignant histiocytomas and fibrous xanthomas. **Cancer** 1963; 16:331-44.

Parente F, Grosgeorge J, Coindre JM, Terrier P, Vilain O, Turc-Carel C. Comparative genomic hybridization reveals novel chromosome deletions in 90 primary soft tissue tumors. **Cancer Genet Cytogenet** 1999; 115:89-95.

Parenti R, Perris R, Vecchio GM, et al. Immunohistochemical expression of Wilms' tumor protein (WT1) in developing human epithelial and mesenchymal tissues. **Acta Histochem** 2012 Jun 4. [Epub ahead of print].

Patra SK. Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1785:182-206.

Pawlak G, Helfman DM. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. **Curr Opin Genet Dev** 2001; 11:41-7.

Pei Z, Fraisl P, Berger J, Jia Z, Forss-Petter S, Watkins PA. Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells. **J Biol Chem** 2004; 279:54454-62.

Pei Z, Sun P, Huang P, et al. Acyl-CoA synthetase VL3 knockdown inhibits human glioma cell proliferation and tumorigenicity. **Cancer Res** 2009; 69:9175-82.

Pennacchioli E, Tosti G, Barberis M, et al. Sarcoma spreads primarily through the vascular system: are there biomarkers associated with vascular spread? **Clin Exp Metastasis** 2012 Jun 15. [Epub ahead of print].

Pérot G, Derré J, Coindre JM, et al. Strong smooth muscle differentiation is dependent on myocardin gene amplification in most human retroperitoneal leiomyosarcomas. **Cancer Res** 2009; 69:2269-78.

Pérot G, Chibon F, Montero A, et al. Constant p53 pathway inactivation in a large series of soft tissue sarcomas with complex genetics. **Am J Pathol** 2010; 177:2080-90.

Picarda G, Lamoureux F, Geffroy L, et al. Preclinical evidence that use of TRAIL in Ewing's sarcoma and osteosarcoma therapy inhibits tumor growth, prevents osteolysis, and increases animal survival. **Clin Cancer Res** 2010; 16:2363-74.

Sandberg AA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: leiomyosarcoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2005; 161:1-19.

Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:59-64.

Segal NH, Pavlidis P, Antonescu CR, et al. Classification and subtype prediction of adult soft tissue sarcoma by functional genomics. **Am J Pathol** 2003; 163:691-700.

Setsu N, Kohashi K, Endo M, et al. Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 in soft tissue leiomyosarcoma is associated with a better prognosis. **Int J Cancer** 2012 May 30. [Epub ahead of print]

Sherr CJ. Cancer cell cycles. **Science** 1996; 274:1672-7.

Shibata T, Chuma M, Kokubu A, Sakamoto M, Hirohashi S. EBP50, a betacatenin-associating protein, enhances Wnt signaling and is over-expressed in hepatocellular carcinoma. **Hepatology** 2003; 38:178-86.

Shlien A, Malkin D. Copy number variations and cancer. **Genome Med** 2009; 1:62.

Simons A, Schepens M, Jeuken J, et al. Frequent loss of 9p21 (p16(INK4A)) and other genomic imbalances in human malignant fibrous histiocytoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 118:89-98.

Skubitz KM, D'Adamo DR. Sarcoma. **Mayo Clin Proc** 2007; 82:1409-32.

Skubitz KM, Pambuccian S, Manivel JC, Skubitz AP. Identification of heterogeneity among soft tissue sarcomas by gene expression profiles from different tumors. **J Transl Med** 2008; 6:23.

Smith SH, Weiss SW, Jankowski SA, et al. SAS amplification in soft tissue sarcomas. **Cancer Res** 1992; 52:3746-9.

Sreekantaiah C. The cytogenetic and molecular characterization of benign and malignant soft tissue tumors. **Cytogenet Cell Genet** 1998; 82:13-29.

Steen S, Stephenson G. Current treatment of soft tissue sarcoma. **Proc Bayl Univ Med Cent** 2008; 21:392-6.

Subramanian S, Lui WO, Lee CH, et al. MicroRNA expression signature of human sarcomas. **Oncogene** 2008; 27:2015-26.

Szymanska J, Virolainen M, Tarkkanen M, et al. Overrepresentation of 1q21-23 and 12q13-21 in lipomalike liposarcomas but not in benign lipomas: A comparative genomic hybridization study. **Cancer Genet Cytogenet** 1997; 99:14-8.

Tarkkanen M, Larramendy ML, Böhling T, et al. Malignant fibrous histiocytoma of bone: analysis of genomic imbalances by comparative genomic hybridisation and C-MYC expression by immunohistochemistry. **Eur J Cancer** 2006; 42:1172-80.

Thompson FH, Nelson MA, Trent JM, et al. Amplification of 19q13.1-q13.2 sequences in ovarian cancer. G-band, FISH, and molecular studies. **Cancer Genet Cytogenet** 1996; 87:55-62.

Thway K. Pathology of soft tissue sarcomas. **Clin Oncol** 2009; 21:695-705.

Toh Y, Kuninaka S, Endo K, et al. Molecular analysis of a candidate metastasis-associated gene, MTA1: possible interaction with histone deacetylase 1. **J Exp Clin Cancer Res** 2000; 19:105-11.

Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal cells. **Stem Cells** 2007; 25:371-9.

Tsiatis AC, Herceg ME, Keedy VL, et al. Prognostic significance of c-Myc expression in soft tissue leiomyosarcoma. **Mod Pathol** 2009; 22:1432-8.

Vasileios KA, Eward WC, Brigman BE. Surgical treatment and prognosis in patients with high-grade soft tissue malignant fibrous histiocytoma of the extremities. **Arch Orthop Trauma Surg** 2012; 132:955-61.

van Unnik JA, Coindre JM, Contesso C, et al. Grading of soft tissue sarcomas: experience of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. **Eur J Cancer** 1993; 29A:2089-93.

Verweij J, Casali P, Zalcberg J, et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomized trial. **Lancet** 2004;364:1127-34.

Verweij J, Baker LH. Future treatment of soft tissue sarcomas will be driven by histological subtype and molecular aberrations. **Eur J Cancer** 2010; 46:863-8.

Wang CY, Wei Q, Han I, et al. Hedgehog and Notch signaling regulate self-renewal of undifferentiated pleomorphic sarcomas. **Cancer Res** 2012; 72:1013-22.

Wang R, Lu YJ, Fisher C, Bridge JA, Shipley J. Characterization of chromosome aberrations associated with soft-tissue leiomyosarcomas by twenty-four-color karyotyping and comparative genomic hybridization analysis. **Genes Chromosomes Cancer** 2001; 31:54-64.

Wang R, Titley JC, Lu YJ, et al. Loss of 13q14-q21 and gain of 5p14-pter in the progression of leiomyosarcoma. **Mod Pathol** 2003; 16:778-85.

Wang S, Ren W, Liu J, et al. TRAIL and doxorubicin combination induces proapoptotic and antiangiogenic effects in soft tissue sarcoma in vivo. **Clin Cancer Res** 2010; 16:2591-604.

Wang X, Yang Z, Zhang H, et al. The estrogen receptor-interacting protein HPIP increases estrogen-responsive gene expression through activation of MAPK and AKT. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1783:1220-8.

Wardelmann E, Schildhaus HU, Merkelbach-Bruse S, et al. Soft tissue sarcoma: from molecular diagnosis to selection of treatment. Pathological diagnosis of soft tissue sarcoma amid molecular biology and targeted therapies. **Ann Oncol** 2010; 21:265-9.

Weiss SW, Enzinger FM: Malignant fibrous histiocytoma: An analysis of 200 cases. **Cancer** 1978; 41:2250-66.

Weissenbacher T, Kuhn C, Mayr D, et al. Expression of mucin-1, galectin-1 and galectin-3 in human leiomyosarcoma in comparison to leiomyoma and myometrium. **Anticancer Res** 2011; 31:451-7.

Weng WH, Ahlén J, Lui WO, et al. Gain of 17q in malignant fibrous histiocytoma is associated with a longer disease-free survival and a low risk of developing distant metastasis. **Br J Cancer** 2003; 89:720-6.

Weng WH, Wejde J, Ahlén J, et al. Characterization of large chromosome markers in a malignant fibrous histiocytoma by spectral karyotyping, comparative genomic hybridization (CGH), and array CGH. **Cancer Genet Cytogenet** 2004; 150:27-32.

Yamakuchi M, Lotterman CD, Bao C, et al. P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:6334-9.

Yamamoto J, Ihara K, Nakayama H, et al. Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. **Life Sci** 2004; 74:1039-49.

Yang D, Ylipaa A, Yang J, et al. An integrated study of aberrant gene copy number and gene expression in GIST and LMS. **Technol Cancer Res Treat** 2010; 9:171-8.

Yang J, Du X, Chen K, et al. Genetic aberrations in soft tissue leiomyosarcoma. **Cancer Lett** 2009; 275:1-8.

Yoo J, Lee HK, Kang CS, et al. p53 gene mutations and p53 protein expression in human soft tissue sarcomas. **Arch Pathol Lab Med** 1997; 121:395-9.

Zhai TL, Nikaido T, Orii A, Horiuchi A, Toki T, Fujii S. Frequent occurrence of loss of heterozygosity among tumor suppressor genes in uterine leiomyosarcoma. **Gynecol Oncol** 1999; 75:453-9.

Zheng M, Simon R, Mirlacher M, et al. TRIO amplification and abundant mRNA expression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer. **Am J Pathol** 2004; 165:63-9.

**Anexo 1 - Regiões genômicas envolvidas em alto nível de ganhos (amplificações) nos Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados avaliados por CGH-array.**

<b>Região cromossômica</b>	<b>Início (pb)</b>	<b>Término (pb)</b>	<b>Tamanho (Mb)</b>	<b>Casos</b>
<b>Cromossomo 1</b>				
1p36.23 - p36.11	8,210,697	26,057,330	17.8	UPS8
1p36.22 - p36.11	12,381,313	26,054,963	13.7	UPS3
1p36.12 - 1p36.11	23,310,408	23,984,190	0.7	UPS22
1p34.2	43,119,437	43,883,908	0.8	UPS19
1p32.1	58,851,998	59,725,733	0.9	UPS21
1p32.3 - 1p31.3	52,817,909	67,346,639	14.5	UPS19
1p32.3 - 1p31.1	51,661,487	79,399,845	27.7	UPS7
1p22.3	86,248,492	87,293,511	1.0	UPS23
1p21.2 - 1p21.1	101,994,591	104,944,086	2.9	UPS23
1p13.3 - 1p13.1	107,710,855	117,517,092	9.8	UPS19
1q21.1 - 1q21.3	147,458,669	150,701,210	3.2	UPS7
1q21.3 - 1q22	149,805,395	153,375,245	3.6	UPS8
1q21.3 - 1q23.1	151,869,652	156,404,455	4.5	UPS7
1q23.2 - 1q25.1	158,351,560	171,925,386	13.6	UPS7
1q24.2	165,535,015	165,681,811	0.1	UPS2
1q24.3 - 1q25.2	169,183,353	175,425,143	6.2	UPS2
1q25.3 - 1q31.1	181,548,028	184,913,558	3.4	UPS9
<b>Cromossomo 2</b>				
2q11.2 - 2q12.1	101,779,657	102,107,210	0.3	UPS5
2q13 - 2q14.3	112,985,668	122,995,390	10.0	UPS19
2q37.1	233,275,013	234,823,200	1.5	UPS6
2q37.2 - 2q37.3	236,551,488	240,492,082	3.9	UPS6
<b>Cromossomo 3</b>				
3p24.1 - 3p22.2	29,723,680	38,565,699	8.8	UPS6
3p12.3 - 3p11.1	78,709,110	89,572,283	10.9	UPS2
3p12.1 - 3p11.2	85,307,248	87,627,650	2.3	UPS15
3p12.1 - 3p11.2	84,576,058	89,013,722	4.4	UPS22
3p12.1 - 3p11.1	84,576,058	89,502,769	4.9	UPS9
3p12.1 - 3p11.1	83,930,024	90,264,177	6.3	UPS19
3q11.2	95,677,501	99,436,731	3.8	UPS2
3q12.1 - 3q13.31	101,068,106	116,614,883	15.5	UPS2
3q21.3 - 3q22.1	129,145,195	131,863,000	2.7	UPS23
<b>Cromossomo 4</b>				
4p16.2	3,145,003	3,433,397	0.3	UPS8
4p16.3 - 4p15.31		0 19,844,723	19.8	UPS16
4p15.31 - 4p15.1	20,077,139	28,894,309	8.8	UPS19
4q12	53,982,288	54,903,020	0.9	UPS2
4q31.21 - 4q31.22	144,662,447	147,097,132	2.4	UPS19
4q31.21 - 4q31.3	143,494,862	153,736,598	10.2	UPS6
4q31.23 - 4q31.3	148,283,855	154,502,850	6.2	UPS19
4q31.3 - 4q32.1	154,655,343	161,196,582	6.5	UPS6
4q34.1	173,921,846	175,851,865	1.9	UPS19
4q35.1 - 4q35.2	185,945,646	187,527,412	1.6	UPS3
4q35.1 - 4q35.2	185,945,646	187,527,412	1.6	UPS8

Cromossomo 5				
5p15.33		0 1,379,268	1.4	UPS9
5p15.33	576,724	2,667,777	2.1	UPS16
5p15.33 - 5p15.1	2,807,401	16,775,912	14.0	UPS6
5p15.2 - 5p15.1	14,017,013	17,555,490	3.5	UPS16
5p15.1	16,356,126	16,693,972	0.3	UPS2
5p15.2 - 5p13.3	14,735,033	31,294,985	16.6	UPS9
5p15.33 - 5p11		0 46,136,124	46.1	UPS15
5p14.1 - 5p13.3	26,493,829	32,792,793	6.3	UPS7
5p13.2 - 5p13.1	37,981,035	40,875,549	2.9	UPS6
5q15	92,342,972	95,815,165	3.5	UPS20
5q31.3 - 5q32	140,350,346	145,664,930	5.3	UPS15
5q33.1	148,365,420	150,874,720	2.5	UPS15
5q33.2 - 5q33.3	154,192,792	158,396,535	4.2	UPS15
Cromossomo 6				
6p21.32	32,017,732	32,333,428	0.3	UPS20
6q15	89,340,547	90,580,275	1.2	UPS2
6q21	111,862,918	113,880,418	2.0	UPS2
6q21 - 6q25.1	105,400,643	151,273,632	45.9	UPS19
6q24.1 - 6q24.3	139,694,708	145,936,176	6.2	UPS7
6q24.2 - 6q25.1	145,112,541	151,364,432	6.3	UPS22
6q24.3 - 6q25.1	147,828,965	149,558,238	1.7	UPS2
6q24.3 - 6q25.2	148,003,844	153,280,984	5.3	UPS16
6q25.2	153,026,122	154,290,208	1.3	UPS22
6q25.3 - 6q26	160,194,411	163,472,725	3.3	UPS22
6q27	165,231,063	169,462,921	4.2	UPS16
Cromossomo 7				
7p22.3 - 7p22.2		0 4,281,455	4.3	UPS4
7p22.3 - 7p21.3		0 7,422,973	7.4	UPS19
7p22.1	6,016,320	6,601,880	0.6	UPS4
7p22.3 - 7p11.1		0 57,613,746	57.6	UPS15
7p15.1	30,199,024	31,497,433	1.3	UPS8
7p14.1	39,255,402	41,474,011	2.2	UPS8
7p14.1	39,255,402	41,607,292	2.4	UPS3
7p13	44,533,256	45,151,383	0.6	UPS4
7p13 - 7p12.1	44,166,466	51,399,206	7.2	UPS7
7p11.2 - 7p11.1	56,227,251	57,613,746	1.4	UPS23
7q21.13 - 7q21.3	90,229,948	92,979,908	2.7	UPS15
7q22.1	99,520,849	100,453,068	0.9	UPS4
7q31.1 - 7q31.2	111,314,696	117,037,157	5.7	UPS19
7q32.1 - 7q33	128,742,049	135,819,661	7.1	UPS7
7q33 - 7q34	136,473,621	138,180,154	1.7	UPS7
7q33 - 7q34	136,763,348	142,764,680	6.0	UPS22
7q36.1	148,339,644	149,684,458	1.3	UPS4
7q36.1 - 7q36.2	152,022,079	154,497,034	2.5	UPS7
7q36.3	156,246,414	156,554,587	0.3	UPS9
Cromossomo 8				
8p23.1	7,096,041	9,803,677	2.7	UPS22
8p23.1 - 8p22	12,456,576	15,300,345	2.8	UPS22
8p12 - 8p11.21	33,025,176	42,857,619	9.8	UPS22
8q11.1 - 8q11.22	47,062,121	50,633,041	3.6	UPS3
8q11.1 - 8q11.22	47,062,121	50,633,041	3.6	UPS8

8q21.3	89,034,061	91,905,292	2.9	UPS22
8q22.1	95,192,091	96,042,972	0.9	UPS22
8q22.1	97,317,090	97,778,075	0.5	UPS22
8q23.3 - 8q24.21	115,965,460	127,639,341	11.7	UPS7
8q24.21 - 8q24.22	130,812,916	134,768,574	4.0	UPS7
<b>Cromossomo 9</b>				
9p24.2 - 9p24.1	2,864,480	5,518,707	2.7	UPS15
9p24.1 - 9p23	5,518,707	10,052,201	4.5	UPS22
9p21.1 - 9p13.1	28,873,767	39,277,118	10.4	UPS15
9q21.11 - 9q21.12	72,464,706	72,952,152	0.5	UPS2
9q21.13	73,816,650	76,605,974	2.8	UPS2
9q13 - 9q22.33	70,091,642	98,215,271	28.1	UPS13
9q21.32 - 9q21.33	84,528,218	87,153,300	2.6	UPS19
9q33.2	123,474,517	123,722,500	0.2	UPS2
9q33.2 - 9q33.3	122,520,239	125,886,208	3.4	UPS16
<b>Cromossomo 10</b>				
10p12.1 - 10p11.22	27,117,247	31,439,903	4.3	UPS2
<b>Cromossomo 11</b>				
11q13.1	65,798,308	66,296,450	0.5	UPS3
11q13.1	65,775,949	66,361,467	0.6	UPS8
11q13.2 - 11q13.3	69,037,623	69,260,341	0.2	UPS2
11q13.3 - 11q13.4	70,284,811	71,315,434	1.0	UPS2
11q13.4	71,661,498	71,913,288	0.3	UPS2
11q14.1 - 11q14.2	81,435,727	85,758,444	4.3	UPS7
11q14.3 - 11q21	91,297,310	93,533,875	2.2	UPS22
11q22.1 - 11q22.3	98,154,597	102,985,079	4.8	UPS9
<b>Cromossomo 12</b>				
12p12.2 - 12p12.1	20,753,050	23,003,831	2.3	UPS19
12q12	39,936,639	42,723,974	2.8	UPS22
12q13.13 - 12q13.2	53,071,686	53,433,337	0.4	UPS2
12q13.2	54,563,533	54,675,760	0.1	UPS2
12q14.1	56,417,326	56,757,588	0.3	UPS2
12q14.2	62,592,684	63,121,807	0.5	UPS2
12q14.3	63,821,156	65,508,767	1.7	UPS2
12q15	66,205,049	67,078,036	0.9	UPS2
12q15	67,291,069	68,879,608	1.6	UPS16
12q15	67,452,629	68,732,133	1.3	UPS2
12q15 - 12q21.1	69,527,538	70,294,157	0.8	UPS16
12q15 - 12q21.1	69,527,538	71,651,671	2.1	UPS2
12q22	93,894,090	94,491,281	0.6	UPS2
12q23.3	105,812,994	106,136,583	0.3	UPS2
12q24.11 - 12q24.23	109,732,691	117,172,381	7.4	UPS16
12q24.23 - 12q24.31	119,072,319	122,245,100	3.2	UPS16
12q24.31	121,447,526	121,772,878	0.3	UPS2
12q24.31	122,521,845	123,371,204	0.8	UPS2
<b>Cromossomo 13</b>				
13q21.2 - 13q21.32	59,162,686	64,922,644	5.8	UPS22
13q21.32	64,244,965	66,769,884	2.5	UPS19
13q32.3 - 13q33.1	98,726,842	102,172,609	3.4	UPS20
13q34	111,408,293	113,891,609	2.5	UPS21

Cromossomo 14				
14q21.3	45,127,765	47,756,630	2.6	UPS8
14q21.3	45,992,734	47,756,630	1.8	UPS3
Cromossomo 15				
15q11.2	20,335,887	20,632,169	0.3	UPS7
15q11.2	20,335,887	22,425,209	2.1	UPS19
15q13.3 - 15q14	30,732,875	32,431,364	1.7	UPS7
15q14	33,646,962	34,648,967	1.0	UPS7
15q14 - 15q15.1	37,686,660	40,611,837	2.9	UPS19
15q25.1	77,972,949	78,116,215	0.1	UPS17
Cromossomo 16				
16p13.3	702,490	1,224,424	0.5	UPS2
16p13.12 - 16p13.11	14,213,365	15,113,217	0.9	UPS2
16p13.11	15,551,975	15,784,277	0.2	UPS15
16p11.2	29,179,964	29,990,444	0.8	UPS22
16p11.2	30,770,305	31,835,614	1.1	UPS22
16p11.2 - 16p11.1	34,059,589	34,847,384	0.8	UPS22
Cromossomo 17				
17p13.1	7,758,156	8,219,743	0.5	UPS19
17p12	12,197,813	13,396,287	1.2	UPS19
17q11.1 - 17q11.2	22,200,000	23,418,565	1.2	UPS22
17q25.1	68,959,478	71,135,780	2.2	UPS23
Cromossomo 18				
18p11.32 - 18p11.21	0	14,918,854	14.9	UPS13
18q11.1 - 18q23	16,100,000	75,949,965	59.8	UPS20
Cromossomo 19				
19p13.3	0	1,407,160	1.4	UPS22
19p13.3	0	2,703,086	2.7	UPS8
19p13.3 - 19p13.2	6,727,433	7,983,508	1.3	UPS22
19p13.2	10,989,031	11,503,836	0.5	UPS8
19p13.13 - 19p13.12	12,719,097	14,713,723	2.0	UPS8
19p13.12 - 19p13.11	15,824,517	16,533,250	0.7	UPS6
19p13.12 - 19p12	15,824,517	21,152,137	5.3	UPS8
19p13.11 - 19p12	17,065,715	24,132,581	7.1	UPS6
19p12	20,899,715	24,132,581	3.2	UPS15
19q12	34,476,517	35,136,907	0.7	UPS7
19q12 - 19q13.11	32,964,337	39,259,969	6.3	UPS20
19q13.11	38,640,151	39,050,184	0.4	UPS23
19q13.11 - 19q13.12	38,983,316	40,939,276	2.0	UPS9
19q13.13 - 19q13.2	43,274,002	44,121,683	0.8	UPS15
19q13.2	44,838,433	45,811,280	1.0	UPS15
19q13.2	45,979,495	46,304,493	0.3	UPS15
19q13.33	54,640,643	55,036,676	0.4	UPS9
Cromossomo 20				
20p11.22 - 20p11.1	21,307,843	26,036,562	4.7	UPS22
20p11.21	22,798,105	24,615,415	1.8	UPS19
20q11.22	31,950,367	32,611,894	0.7	UPS23
20q11.22	32,084,089	33,339,819	1.3	UPS8
20q11.22 - 20q11.23	33,204,027	34,910,491	1.7	UPS23
20q13.12	43,868,407	44,014,138	0.1	UPS23
20q13.13	46,251,058	47,352,003	1.1	UPS23
20q13.12 - 20q13.2	45,708,126	49,858,309	4.2	UPS8

20q13.12 - 20q13.2	43,475,757	52,743,075	9.3	UPS15
20q13.12 - 20q13.32	45,708,126	56,643,656	10.9	UPS19
<b>Cromossomo 21</b>				
21q21.1	16,054,716	21,642,572	5.6	UPS2
21q21.3	29,811,466	30,116,748	0.3	UPS2
21q22.11	32,830,247	33,826,888	1.0	UPS2
21q22.13 - 21q22.2	38,433,505	39,219,389	0.8	UPS2
21q22.2	39,773,512	40,920,066	1.1	UPS2
21q22.3	41,670,071	42,301,579	0.6	UPS2
21q22.3	43,298,733	45,804,653	2.5	UPS2
<b>Cromossomo 22</b>				
22q11.21 - 22q11.23	17,149,220	23,320,203	6.2	UPS19
22q13.31	45,003,644	45,829,173	0.8	UPS19

**Anexo 2 - Regiões genômicas envolvidas em deleções homocigotas nos Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados avaliados por CGH-array.**

<b>Região cromossômica</b>	<b>Início (pb)</b>	<b>Término (pb)</b>	<b>Tamanho(Mb)</b>	<b>Casos</b>
<b>Cromossomo 1</b>				
1q43	236,266,770	237,442,553	1.2	UPS19
<b>Cromossomo 3</b>				
3p24.2 - p24.1	24,514,176	27,781,530	3.3	UPS19
<b>Cromossomo 4</b>				
4p15.33 - 4p15.32	13,991,733	15,443,476	1.5	UPS19
4p15.32 - 4p15.31	17,224,820	19,712,788	2.5	UPS19
4q31.3 - 4q32.1	154,502,850	157,971,162	3.5	UPS19
4q34.1 - 4q34.3	175,851,865	180,486,438	4.6	UPS19
4q35.1	184,736,825	186,650,317	1.9	UPS19
<b>Cromossomo 8</b>				
8p23.3	0	1,180,822	1.2	UPS7
8p23.3 - p23.1	0	6,268,100	6.3	UPS22
8p23.2	2,895,708	4,808,519	1.9	UPS7
<b>Cromossomo 9</b>				
9p24.3	0	1,850,464	1.9	UPS19
9p24.3 - 9p24.2	928,381	2,466,883	1.5	UPS22
9p21.3	21,307,885	22,226,425	0.9	UPS19
9p21.3	20,575,438	24,079,542	3.5	UPS22
9p21.3	21,635,402	23,797,704	2.2	UPS6
<b>Cromossomo 10</b>				
10p11.22 - p11.21	31,662,463	34,837,896	3.2	UPS19
<b>Cromossomo 11</b>				
11p14.3 - p14.1	22,628,285	27,406,395	4.8	UPS19
11q14.3	89,401,974	90,269,147	0.9	UPS2
11q24.2 - 11q24.3	125,921,191	127,615,525	1.7	UPS15
11q24.3	128,110,289	128,663,728	0.6	UPS19
11q24.3 - 11q25	129,587,715	134,452,384	4.9	UPS19
<b>Cromossomo 13</b>				
13q14.2 - 13q14.3	47,631,329	49,552,885	1.9	UPS23
13q14.3	50,081,552	50,515,686	0.4	UPS9
13q21.32 -				
13q21.33	64,922,644	68,547,396	3.6	UPS20
13q22.3 - 13q31.1	76,472,864	80,566,696	4.1	UPS6
<b>Cromossomo 15</b>				
15q14	31,579,454	32,431,364	0.9	UPS15
<b>Cromossomo 16</b>				
16p13.11 - p12.3	16,012,070	17,970,090	2.0	UPS22
16q24.3	88,426,464	88,622,785	0.2	UPS7
<b>Cromossomo 17</b>				
17p13.1	7,496,964	7,591,789	0.1	UPS22
<b>Cromossomo 18</b>				
18q22.1 - q22.3	60,509,861	69,306,355	8.8	UPS19
<b>Cromossomo 19</b>				
19p12	23,653,638	24,132,581	0.5	UPS19

---

Cromossomo 21				
21q11.2 - 21q21.1	14,397,726	15,557,119	1.2	UPS19
21q21.1	18,282,051	20,281,922	2.0	UPS19
21q22.11	30,971,659	31,174,960	0.2	UPS23

---

**Anexo 3 - Regiões genômicas envolvidas em alto nível de ganhos (amplificações) nos Leiomiossarcomas avaliados por CGH-array.**

<b>Região cromossômica</b>	<b>Início (pb)</b>	<b>Término (pb)</b>	<b>Tamanho(Mb)</b>	<b>Casos</b>
<b>Cromossomo 1</b>				
1p36.21 - p36.13	13,858,751	17,012,861	3.2	LMS3
<b>Cromossomo 2</b>				
2q14.1 - q14.2	118,377,267	120,195,610	1.8	LMS20
<b>Cromossomo 3</b>				
3p12.1 - p11.1	86,936,056	90,264,177	3.3	LMS3
3p12.1 - p11.2	85,858,296	87,821,779	2.0	LMS20
3q13.33	121,160,608	121,816,869	0.7	LMS20
<b>Cromossomo 5</b>				
5p15.33 - p15.1	0	17,950,610	18.0	LMS8
5q11.2	55,167,345	57,807,333	2.6	LMS20
<b>Cromossomo 9</b>				
9q21.11 - q21.13	70,864,667	73,157,374	2.3	LMS23
9q21.33 - q22.1	88,077,556	90,992,216	2.9	LMS23
<b>Cromossomo 12</b>				
12q13.13 - q14.1	52,160,346	58,377,214	6.2	LMS20
12q14.1	56,342,657	56,757,588	0.4	LMS9
12q24.33	131,195,008	131,985,421	0.8	LMS4
<b>Cromossomo 13</b>				
13q33.2 - q34	104,540,813	113,788,538	9.2	LMS18
<b>Cromossomo 14</b>				
14q13.2 - q13.3	34,798,130	35,734,738	0.9	LMS9
<b>Cromossomo 15</b>				
15q11.2 - q12	20,335,887	25,261,935	4.9	LMS20
<b>Cromossomo 16</b>				
16p13.3 - p11.2	0	31,835,614	31.8	LMS8
<b>Cromossomo 17</b>				
17p13.1 - p11.2	7,523,959	21,414,397	13.9	LMS17
17p13.1 - q11.1	10,117,028	22,200,000	12.1	LMS18
17p13.1 - q11.1	9,168,732	22,200,000	13.0	LMS22
17q25.1	70,591,236	70,728,683	0.1	LMS18
<b>Cromossomo 20</b>				
20p12.1 - p11.22	15,002,817	21,934,831	6.9	LMS8
<b>Cromossomo 21</b>				
21p11.1	10,013,263	10,117,957	0.1	LMS6, LMS7 e LMS 8
21q21.2 - q21.3	25,142,540	29,601,195	4.5	LMS20
<b>Cromossomo 22</b>				
22q13.33	49,000,802	49,691,432	0.7	LMS22

**Anexo 4** - Regiões genômicas envolvidas em deleções homozigotas nos Leiomiossarcomas avaliados por CGH-array.

<b>Região cromossômica</b>	<b>Início (pb)</b>	<b>Término (pb)</b>	<b>Tamanho(Mb)</b>	<b>Casos</b>
<b>Cromossomo 1</b>				
1p31.1	69,628,709	75,752,098	6.12	LMS5
1p31.3	65,683,848	66,363,824	0.68	LMS5
<b>Cromossomo 2</b>				
2p22.2	37,222,347	38,184,265	0.96	LMS5
<b>Cromossomo 5</b>				
5q11.2	58,125,458	58,867,597	0.74	LMS6
<b>Cromossomo 6</b>				
6p25.3	0	323.864	0.32	LMS18
6p25.3	0	323.864	0.32	LMS22
<b>Cromossomo 7</b>				
7p22.3	0	1,048,660	1.05	LMS8
<b>Cromossomo 9</b>				
9p21.3	20,789,523	22,067,827	1.28	LMS19
9p21.3	21,820,221	22,226,425	0.41	LMS23
<b>Cromossomo 10</b>				
10q25.2	112,023,172	114,019,533	2.00	LMS16
<b>Cromossomo 11</b>				
11q14.3 - q21	91,297,310	93,170,434	1.87	LMS8
11q22.1 - q22.3	97,617,684	105,210,032	7.59	LMS8
<b>Cromossomo 12</b>				
12q22	91,831,451	92,676,187	0.84	LMS6
<b>Cromossomo 13</b>				
13q13.3	36,491,383	37,721,867	1.23	LMS5
13q14.3	49,480,922	50,515,686	1.03	LMS8
13q21.31 - q21.33	63,563,667	69,213,280	5.65	LMS5
13q32.3	99,018,585	99,754,732	0.74	LMS16
<b>Cromossomo 14</b>				
14q11.1 - q11.2	18,590,707	19,668,074	1.08	LMS3
<b>Cromossomo 19</b>				
19p13.2	10,920,120	11,128,540	0.21	LMS6
<b>Cromossomo 21</b>				
21q22.3	46,806,563	46,944,323	0.14	LMS6
<b>Cromossomo 22</b>				
22q12.1 - q12.2	27,653,726	27,929,293	0.28	LMS23
22q13.1	37,674,049	37,729,129	0.06	LMS20

**Anexo 5** - Análise comparativa das alterações genômicas presentes em mais de 30% dos casos nos SPI e LMS ( $P < 0,05$ ).

Região cromossômica	Início	Término	Evento	Genes	miRNAs	Tamanho (pb)	Frequência SPI (%)	Frequência LMS (%)	Diferença	P-Valor	CNV (%)
Cromossomo 1											
p36.33	1,491,815	2,208,384	Ganhos	40	0	716569	45	12	33	0.036	94.4
p36.33 - p36.32	2,208,384	2,689,845	Ganhos	18	0	481461	50	12	38	0.017	100.0
p36.32	2,689,845	3,356,322	Ganhos	8	0	666477	45	12	33	0.036	52.0
p36.23	7,979,723	8,210,697	Ganhos	2	0	230974	45	6	39	0.010	40.9
p36.23	8,210,697	8,826,293	Ganhos	4	0	615596	50	6	44	0.004	45.8
p36.23	8,210,697	9,038,746	Perdas	10	0	828049	5	35	-30	0.033	35.9
p36.23 - p36.22	8,826,293	9,289,264	Ganhos	12	1	462971	45	6	39	0.010	37.6
p36.22	9,289,264	10,551,849	Ganhos	26	0	1262585	50	6	44	0.004	35.8
p36.22	10,501,190	11,228,674	Perdas	13	0	727484	5	35	-30	0.033	55.3
p36.22	10,551,849	11,228,674	Ganhos	13	0	676825	50	12	38	0.017	58.9
p36.22	11,228,674	11,999,476	Ganhos	24	0	770802	50	6	44	0.004	5.3
p36.22	11,228,674	12,004,912	Perdas	26	0	776238	5	41	-36	0.014	5.3
p36.22	11,999,476	12,593,021	Ganhos	11	0	593545	45	6	39	0.010	49.5
p36.22 - p36.21	12,593,021	13,763,726	Ganhos	33	0	1170705	40	6	34	0.023	98.8
p36.22 - p36.21	12,004,912	15,139,106	Perdas	48	0	3134194	5	35	-30	0.033	50.8
p36.21 - p36.13	15,588,391	16,217,396	Ganhos	28	0	629005	45	12	33	0.036	26.5
p36.13	16,217,396	16,619,945	Ganhos	13	0	402549	50	12	38	0.017	16.5
p36.13	16,619,945	17,213,647	Ganhos	24	0	593702	45	12	33	0.036	100.0
p36.11	24,910,609	25,074,965	Ganhos	1	0	164356	40	6	34	0.023	4.5
p36.11	27,136,484	27,406,836	Ganhos	6	0	270352	40	6	34	0.023	22.0
p35.2 - p35.1	31,835,081	32,570,124	Ganhos	27	0	735043	40	6	34	0.023	55.4
p35.1	32,570,124	32,815,083	Ganhos	12	0	244959	45	6	39	0.010	0.2
p35.1	32,815,083	32,882,706	Ganhos	5	0	67623	40	6	34	0.023	9.5
p34.2	41,351,795	41,551,926	Ganhos	2	0	200131	30	0	30	0.022	2.5
p34.2	41,551,926	42,203,467	Ganhos	4	0	651541	35	0	35	0.009	1.6
p34.2	42,203,467	42,434,184	Ganhos	5	0	230717	30	0	30	0.022	1.7
p34.2	42,533,020	42,579,359	Ganhos	1	0	46339	30	0	30	0.022	0.0

p34.2	43,081,662	43,169,835	Ganhos	4	0	88173	30	0	30	0.022	2.3
p34.2	43,169,835	43,495,362	Ganhos	7	0	325527	35	0	35	0.009	0.9
p34.1	45,738,575	45,842,892	Ganhos	4	0	104317	30	0	30	0.022	0.0
p34.1 - p33	45,938,326	46,665,318	Ganhos	17	0	726992	30	0	30	0.022	30.5
p32.2 - p32.1	57,694,851	58,710,284	Ganhos	5	0	1015433	30	0	30	0.022	2.7
p32.1	58,710,284	58,851,998	Ganhos	3	0	141714	35	0	35	0.009	0.4
p32.1	58,851,998	59,725,733	Ganhos	8	0	873735	40	0	40	0.004	19.9
p32.1	59,725,733	60,586,219	Ganhos	6	0	860486	35	0	35	0.009	8.5
p31.3	65,683,848	66,363,824	Perdas	4	0	679976	0	35	-35	0.005	20.5
p31.1	69,628,709	70,094,198	Perdas	1	0	465489	0	35	-35	0.005	2.0
p31.1	70,094,198	71,997,088	Perdas	17	1	1902890	5	35	-30	0.033	13.1
p31.1	71,997,088	74,023,708	Perdas	2	0	2026620	5	41	-36	0.014	35.3
p31.1	74,023,708	74,855,046	Perdas	6	0	831338	0	41	-41	0.002	0.4
p31.1	74,855,046	75,752,098	Perdas	8	0	897052	5	35	-30	0.033	3.1
q22	154,476,720	154,578,687	Ganhos	12	0	101967	45	12	33	0.036	0.0
q22 - q23.1	154,578,687	155,177,798	Ganhos	31	2	599111	50	12	38	0.017	2.9
q23.1	155,177,798	155,213,858	Ganhos	2	0	36060	45	6	39	0.010	0.0
q23.1	155,213,858	155,272,136	Ganhos	1	0	58278	40	6	34	0.023	0.0
q24.2	165,535,015	167,579,442	Ganhos	26	2	2044427	30	0	30	0.022	43.2
q24.3 - q25.1	169,183,353	171,925,386	Ganhos	36	3	2742033	30	0	30	0.022	35.7
q31.2 - q31.3	191,347,482	194,067,539	Perdas	3	1	2720057	40	6	34	0.023	22.0
q31.3	194,673,172	195,305,785	Perdas	11	0	632613	45	12	33	0.036	72.8
q31.3	195,371,599	195,739,575	Perdas	3	0	367976	40	6	34	0.023	21.6
q32.1	197,964,249	198,593,558	Perdas	6	0	629309	30	0	30	0.022	3.3
q32.3	210,621,517	211,243,725	Perdas	16	0	622208	30	0	30	0.022	51.7
q32.3 - q41	211,243,725	212,876,860	Perdas	12	0	1633135	35	0	35	0.009	2.7
q41	212,876,860	214,486,070	Perdas	5	0	1609210	40	0	40	0.004	3.6
q41	214,486,070	216,990,142	Perdas	6	0	2504072	35	0	35	0.009	12.0
q41	216,990,142	218,919,451	Perdas	20	3	1929309	40	0	40	0.004	2.0
q41	218,919,451	219,295,383	Perdas	5	0	375932	35	0	35	0.009	5.4
q41	219,295,383	219,802,749	Perdas	1	0	507366	30	0	30	0.022	0.6
q41 - q42.12	220,570,404	223,676,375	Perdas	40	1	3105971	30	0	30	0.022	40.0
q42.2	229,122,626	229,161,130	Perdas	2	0	38504	30	0	30	0.022	0.0

q42.2	229,161,130	229,194,462	Perdas	3	0	33332	35	0	35	0.009	0.0
q42.2 - q42.3	229,194,462	233,337,455	Perdas	42	1	4142993	40	0	40	0.004	41.9
q42.3 - q43	233,337,455	234,776,800	Perdas	23	1	1439345	35	0	35	0.009	40.9
q43	234,776,800	239,736,121	Perdas	17	0	4959321	40	0	40	0.004	33.6
q43	239,736,121	239,759,320	Perdas	1	0	23199	45	0	45	0.002	0.0
q43	239,759,320	239,894,714	Perdas	4	0	135394	40	0	40	0.004	17.3
q43	239,894,714	241,411,205	Perdas	8	0	1516491	35	0	35	0.009	44.9
q43 - q44	241,411,205	242,105,905	Perdas	6	0	694700	40	0	40	0.004	24.5
q44	242,105,905	242,408,855	Perdas	4	0	302950	45	0	45	0.002	0.6
q44	242,408,855	244,884,837	Perdas	20	0	2475982	40	0	40	0.004	44.8
q44	246,386,110	247,249,719	Perdas	30	0	863609	45	12	33	0.036	89.4
Cromossomo 2											
q11.2	96,302,349	96,929,125	Ganhos	21	0	626776	40	6	34	0.023	13.8
q11.2	96,929,125	97,777,483	Ganhos	15	0	848358	40	0	40	0.004	91.5
q11.2	97,777,483	98,202,102	Ganhos	4	0	424619	35	0	35	0.009	1.7
q11.2	98,202,102	99,449,598	Ganhos	21	0	1247496	30	0	30	0.022	28.9
q14.2	121,025,141	121,766,064	Perdas	5	0	740923	30	0	30	0.022	4.0
q14.3	127,467,910	127,534,593	Perdas	1	0	66683	35	0	35	0.009	32.2
Cromossomo 3											
p26.3	0	726,469	Perdas	4	0	726469	55	12	43	0.014	95.2
p26.3	726,469	1,973,707	Perdas	3	0	1247238	50	12	38	0.017	72.6
p26.3	1,973,707	2,925,487	Perdas	1	0	951780	45	12	33	0.036	100.0
p26.3 - p26.2	2,925,487	3,837,526	Perdas	8	0	912039	45	6	39	0.010	92.7
p26.2 - p26.1	3,837,526	7,194,180	Perdas	18	0	3356654	40	6	34	0.023	26.4
p25.3	9,328,447	9,850,063	Perdas	27	0	521616	30	0	30	0.022	6.2
p25.3	9,850,063	10,185,858	Perdas	25	0	335795	35	0	35	0.009	8.4
p25.3	10,185,858	11,275,799	Perdas	17	1	1089941	30	0	30	0.022	5.4
p25.1 - p24.3	13,468,331	14,924,734	Perdas	22	0	1456403	30	0	30	0.022	36.1
p21.31	47,765,586	48,122,442	Perdas	7	1	356856	30	0	30	0.022	11.1
p21.31 - p21.2	50,638,063	51,501,847	Perdas	8	0	863784	30	0	30	0.022	25.1
p21.1	53,318,057	53,872,071	Perdas	6	0	554014	30	0	30	0.022	0.0
p14.3 - p14.2	56,374,591	58,665,336	Perdas	31	0	2290745	40	6	34	0.023	5.6
q23	143,175,282	143,554,594	Perdas	5	0	379312	30	0	30	0.022	90.4

q25.2	153,662,003	154,015,789	Perdas	1	0	353786	30	0	30	0.022	74.4
q25.2 - q25.31	154,015,789	157,031,277	Perdas	20	0	3015488	35	0	35	0.009	15.8
q25.31	157,031,277	157,090,862	Perdas	2	0	59585	30	0	30	0.022	0.0
q25.32 - q25.33	159,313,048	161,097,748	Perdas	14	0	1784700	30	0	30	0.022	7.0
q25.33 - q26.1	161,097,748	161,820,237	Perdas	18	2	722489	35	0	35	0.009	4.0
q26.1	161,820,237	162,012,616	Perdas	2	0	192379	40	0	40	0.004	17.0
q26.1	162,012,616	168,076,332	Perdas	14	2	6063716	40	6	34	0.023	53.1
q26.2	170,326,390	171,889,311	Perdas	23	0	1562921	30	0	30	0.022	18.3
q26.2 - q26.31	171,889,311	173,307,960	Perdas	14	1	1418649	35	0	35	0.009	0.4
q26.33 - q27.1	181,483,714	184,609,382	Perdas	23	0	3125668	30	0	30	0.022	7.4
q29	197,456,850	198,136,250	Perdas	20	0	679400	30	0	30	0.022	100.0
q29	198,981,971	199,501,827	Perdas	9	0	519856	30	0	30	0.022	89.4
Cromossomo 4											
q35.2	190,619,560	191,273,063	Perdas	7	0	653503	40	6	34	0.023	96.6
Cromossomo 6											
q13	74,442,385	74,514,163	Perdas	2	0	71778	40	6	34	0.023	2.2
q13	74,514,163	75,584,859	Perdas	2	0	1070696	45	6	39	0.010	31.7
q13 - q14.1	75,584,859	76,314,627	Perdas	6	0	729768	40	0	40	0.004	22.1
q14.1	76,314,627	79,671,820	Perdas	7	0	3357193	45	0	45	0.002	35.6
q14.1 - q14.2	79,671,820	84,523,832	Perdas	29	0	4852012	45	6	39	0.010	14.3
q14.2 - q14.3	84,523,832	85,002,366	Perdas	4	0	478534	40	6	34	0.023	18.9
q14.3	85,157,478	86,384,667	Perdas	6	0	1227189	35	0	35	0.009	4.3
q14.3 - q15	86,384,667	88,324,031	Perdas	17	0	1939364	30	0	30	0.022	33.5
q15	88,324,031	90,140,299	Perdas	19	0	1816268	35	0	35	0.009	18.6
q15	90,140,299	90,893,597	Perdas	8	0	753298	30	0	30	0.022	6.2
q15	90,893,597	91,305,081	Perdas	4	0	411484	35	0	35	0.009	1.2
q15 - q16.1	91,305,081	92,922,524	Perdas	3	0	1617443	30	0	30	0.022	39.3
q16.1 - q16.2	94,104,295	99,418,572	Perdas	17	1	5314277	40	6	34	0.023	27.8
q16.3	103,517,778	104,668,196	Perdas	0	0	1150418	45	12	33	0.036	89.8
q16.3 - q21	104,668,196	105,307,430	Perdas	1	0	639234	40	6	34	0.023	14.8
q21	105,307,430	105,376,848	Perdas	1	0	69418	40	0	40	0.004	100.0
q21	105,376,848	106,787,108	Perdas	11	0	1410260	35	0	35	0.009	33.4
q21	106,787,108	107,190,817	Perdas	5	0	403709	40	0	40	0.004	11.7

q21	107,190,817	109,572,068	Perdas	29	1	2381251	35	0	35	0.009	21.1
q21	109,572,068	109,748,941	Perdas	5	0	176873	40	0	40	0.004	4.3
q21	109,748,941	111,112,032	Perdas	21	0	1363091	45	0	45	0.002	22.1
q21	111,112,032	111,862,918	Perdas	15	0	750886	45	6	39	0.010	9.7
q21	111,862,918	113,880,418	Perdas	14	0	2017500	40	0	40	0.004	17.5
q21 - q22.1	113,880,418	114,486,979	Perdas	8	0	606561	45	0	45	0.002	15.1
q22.1	114,486,979	115,087,743	Perdas	2	0	600764	45	6	39	0.010	85.8
q22.1	115,087,743	117,096,818	Perdas	17	0	2009075	40	6	34	0.023	48.7
q23.3 - q24.1	138,520,382	139,694,708	Perdas	21	0	1174326	30	0	30	0.022	29.6
q27	166,057,078	167,660,747	Perdas	24	1	1603669	30	0	30	0.022	36.8
<b>Cromossomo 7</b>											
p22.3	919,644	1,554,157	Ganhos	20	1	634513	55	18	37	0.040	80.8
p22.3	1,554,157	2,007,180	Ganhos	10	0	453023	55	6	49	0.002	68.7
p22.3 - p22.2	2,007,180	2,113,992	Ganhos	2	0	106812	50	6	44	0.004	100.0
p22.2	2,113,992	2,337,936	Ganhos	6	0	223944	55	6	49	0.002	17.4
p22.2	2,337,936	2,784,584	Ganhos	13	0	446648	50	6	44	0.004	41.2
p22.2	2,784,584	3,726,487	Ganhos	4	0	941903	45	6	39	0.010	34.3
p22.2	3,726,487	4,281,455	Ganhos	1	0	554968	50	6	44	0.004	69.5
p22.2 - p22.1	4,281,455	4,603,228	Ganhos	0	0	321773	45	6	39	0.010	100.0
p22.1	4,603,228	4,852,432	Ganhos	7	0	249204	50	6	44	0.004	81.6
p22.1	4,852,432	4,978,189	Ganhos	6	0	125757	50	0	50	0.001	91.1
p22.1 - p21.3	4,978,189	7,790,136	Ganhos	57	1	2811947	45	0	45	0.002	88.2
p21.3	7,790,136	8,220,924	Ganhos	4	0	430788	50	0	50	0.001	86.5
p21.3	8,220,924	9,060,255	Ganhos	4	0	839331	45	0	45	0.002	21.2
p21.3	9,060,255	12,347,493	Ganhos	9	0	3287238	40	0	40	0.004	33.6
p21.3 - p21.1	12,347,493	17,326,246	Ganhos	28	0	4978753	45	0	45	0.002	55.9
p21.1 - p15.3	17,326,246	19,737,692	Ganhos	14	1	2411446	50	0	50	0.001	54.0
p15.3	19,737,692	20,386,954	Ganhos	3	0	649262	45	0	45	0.002	7.4
p15.3	20,386,954	21,185,472	Ganhos	4	0	798518	50	0	50	0.001	7.4
p15.3	21,185,472	24,606,960	Ganhos	32	1	3421488	55	0	55	0.000	28.0
p15.3 - p15.2	24,606,960	27,141,203	Ganhos	28	1	2534243	50	0	50	0.001	7.7
p15.2	27,141,203	27,895,524	Ganhos	24	1	754321	55	0	55	0.000	35.2
p15.2 - p15.1	27,895,524	29,711,868	Ganhos	24	0	1816344	50	0	50	0.001	21.4

p15.1 - p14.1	29,711,868	38,886,485	Ganhos	121	4	9174617	45	0	45	0.002	26.4
p14.1	38,886,485	41,843,846	Ganhos	21	0	2957361	50	6	44	0.004	14.9
p14.1	41,843,846	42,519,669	Ganhos	1	0	675823	45	6	39	0.010	2.9
p14.1 - p13	42,519,669	43,355,549	Ganhos	8	0	835880	50	6	44	0.004	6.1
p13	43,355,549	44,075,653	Ganhos	26	0	720104	55	6	49	0.002	32.5
p13	44,075,653	44,166,466	Ganhos	8	0	90813	55	12	43	0.014	100.0
p13	44,166,466	44,198,241	Ganhos	1	0	31775	60	12	48	0.006	100.0
p13	44,198,241	44,985,826	Ganhos	22	0	787585	60	6	54	0.001	6.5
p13	44,985,826	46,441,258	Ganhos	21	0	1455432	60	0	60	0.000	26.0
p13 - p12.3	46,441,258	49,191,724	Ganhos	16	0	2750466	55	0	55	0.000	19.0
p12.3 - p11.2	49,191,724	54,666,480	Ganhos	19	0	5474756	55	6	49	0.002	38.4
p11.2	54,666,480	55,699,462	Ganhos	10	0	1032982	50	6	44	0.004	30.1
p11.2	55,699,462	56,227,251	Ganhos	19	0	527789	45	6	39	0.010	100.0
p11.2	56,227,251	56,534,393	Ganhos	3	0	307142	50	6	44	0.004	100.0
p11.2 - p11.1	56,534,393	57,613,746	Ganhos	10	0	1079353	45	6	39	0.010	100.0
q11.21	62,153,588	63,633,658	Ganhos	16	0	1480070	35	0	35	0.009	73.8
q11.21	63,633,658	64,926,018	Ganhos	28	0	1292360	30	0	30	0.022	100.0
q22.1	99,529,285	99,647,068	Ganhos	21	2	117783	45	12	33	0.036	54.2
q22.1	101,304,844	101,890,076	Ganhos	14	1	585232	45	12	33	0.036	65.9
q31.1	107,998,952	111,040,235	Ganhos	6	0	3041283	30	0	30	0.022	45.7
q31.1	111,740,442	112,221,908	Ganhos	4	0	481466	30	0	30	0.022	100.0
q31.1 - q31.2	112,221,908	116,191,043	Ganhos	25	0	3969135	35	0	35	0.009	23.0
q31.2	116,191,043	117,037,157	Ganhos	17	0	846114	30	0	30	0.022	2.2
q31.2 - q31.31	117,037,157	118,010,945	Ganhos	5	0	973788	35	0	35	0.009	14.5
q31.31	120,102,164	120,509,397	Ganhos	4	0	407233	40	6	34	0.023	3.0
q32.1	127,035,525	127,181,618	Ganhos	2	0	146093	30	0	30	0.022	0.0
q32.1	127,181,618	128,040,665	Ganhos	19	2	859047	35	0	35	0.009	36.6
q32.1 - q32.2	128,040,665	129,792,586	Ganhos	46	3	1751921	40	0	40	0.004	25.6
q32.2 - q32.3	129,792,586	131,124,061	Ganhos	25	3	1331475	45	0	45	0.002	25.9
q32.3 - q33	131,124,061	135,644,386	Ganhos	39	0	4520325	40	0	40	0.004	18.7
q33	135,644,386	135,819,661	Ganhos	0	0	175275	45	0	45	0.002	2.7
q33	135,819,661	136,473,621	Ganhos	3	1	653960	40	0	40	0.004	0.2
q33 - q34	136,473,621	137,354,848	Ganhos	7	0	881227	45	0	45	0.002	93.6

q34	137,354,848	138,569,463	Ganhos	14	0	1214615	35	0	35	0.009	66.9
q34	138,569,463	138,645,767	Ganhos	1	0	76304	30	0	30	0.022	11.0
q34	138,836,331	139,228,650	Ganhos	3	0	392319	30	0	30	0.022	1.4
q36.1	147,525,862	148,296,544	Ganhos	8	1	770682	30	0	30	0.022	11.4
q36.1	150,458,530	150,491,096	Ganhos	3	0	32566	45	6	39	0.010	100.0
q36.1	150,491,096	150,639,483	Ganhos	7	1	148387	40	6	34	0.023	40.3
q36.1	150,639,483	151,245,235	Ganhos	13	0	605752	45	6	39	0.010	14.0
q36.1	151,245,235	151,290,649	Ganhos	1	0	45414	40	6	34	0.023	0.0
q36.3	156,246,414	156,554,587	Ganhos	7	0	308173	40	6	34	0.023	11.4
Cromossomo 8											
p23.2	3,023,185	4,808,519	Perdas	2	0	1785334	45	12	33	0.036	72.2
p23.2 - p23.1	5,877,989	7,096,041	Perdas	24	0	1218052	45	12	33	0.036	91.3
p23.1	9,074,377	9,803,677	Perdas	11	2	729300	40	6	34	0.023	100.0
p23.1	9,803,677	10,165,407	Perdas	1	0	361730	45	6	39	0.010	100.0
p23.1	11,325,825	12,027,910	Perdas	20	0	702085	40	6	34	0.023	100.0
p23.1	12,027,910	12,456,576	Perdas	18	0	428666	45	6	39	0.010	100.0
p23.1 - p22	12,456,576	13,310,177	Perdas	16	0	853601	40	6	34	0.023	42.2
q21.2 - q21.3	87,140,925	87,366,178	Perdas	3	0	225253	35	0	35	0.009	26.3
q21.3	87,366,178	88,953,683	Perdas	9	0	1587505	30	0	30	0.022	84.4
q24.3	143,837,982	143,934,407	Ganhos	3	0	96425	15	53	-38	0.032	88.1
q24.3	143,934,407	144,412,186	Ganhos	9	0	477779	20	59	-39	0.021	35.7
q24.3	144,412,186	144,565,091	Ganhos	7	0	152905	20	53	-33	0.047	83.8
q24.3	146,005,349	146,274,826	Ganhos	10	0	269477	25	59	-34	0.050	55.5
Cromossomo 9											
p22.1 - p21.3	18,911,919	20,010,147	Perdas	15	0	1098228	55	18	37	0.040	100.0
p21.2	27,076,520	27,589,527	Perdas	9	0	513007	50	12	38	0.017	11.9
p21.2 - p21.1	27,589,527	30,274,265	Perdas	5	2	2684738	45	12	33	0.036	69.9
p21.1	30,274,265	30,875,369	Perdas	0	0	601104	50	12	38	0.017	100.0
p21.1	30,875,369	31,588,911	Perdas	0	0	713542	45	6	39	0.010	57.2
p21.1	31,588,911	32,108,149	Perdas	0	0	519238	40	6	34	0.023	20.2
p21.1	32,108,149	32,430,740	Perdas	2	0	322591	40	0	40	0.004	6.6
p21.1 - p13.3	32,430,740	33,026,792	Perdas	13	0	596052	35	0	35	0.009	25.4
p13.3	33,026,792	33,051,222	Perdas	2	0	24430	30	0	30	0.022	1.3

Cromossomo 11											
q24.3	128,797,830	129,260,043	Perdas	4	0	462213	45	12	33	0.036	3.4
Cromossomo 13											
q32.3	98,164,651	99,018,585	Perdas	14	1	853934	55	18	37	0.040	15.2
q33.2 - q34	104,540,813	109,139,700	Perdas	17	1	4598887	45	12	33	0.036	35.2
q34	109,578,251	111,028,329	Perdas	17	0	1450078	40	6	34	0.023	31.3
Cromossomo 14											
q24.3	77,320,079	77,447,246	Perdas	1	0	127167	40	6	34	0.023	16.6
Cromossomo 17											
p13.3 - p13.2	3,473,279	4,630,692	Perdas	34	0	1157413	5	41	-36	0.014	68.6
p13.2	4,735,946	5,097,540	Perdas	35	0	361594	5	41	-36	0.014	35.0
p13.1	6,865,672	7,428,080	Perdas	55	1	562408	5	41	-36	0.014	8.4
p13.1	7,956,138	8,145,296	Perdas	22	0	189158	5	35	-30	0.033	39.9
Cromossomo 20											
p11.21	23,206,367	23,302,271	Ganhos	2	0	95904	45	12	33	0.036	0.0
q13.33	61,137,054	61,645,574	Ganhos	28	1	508520	75	41	34	0.050	100.0

**Anexo 6** - Alterações genômicas observadas exclusivamente nos pacientes que desenvolveram metástases à distância ( $P < 0,05$ ).

Região	Início	Término	Evento	Genes	miRNAs	Tamanho (pb)	Ausência Metastáse (%)	Presença Metastáse (%)	P-Valor	CNV (%)
Cromossomo 3										
q11.2 - q12.2	95,088,205	101,738,996	Perda	51	0	6650791	0	27.3	0.021	11
q12.2 - q12.3	101,738,996	103,104,466	Perda	22	0	1365470	0	36.4	0.005	31
q13.13 - q13.31	112,769,124	115,247,042	Perda	44	1	2477918	0	36.4	0.005	15
q13.31	115,247,042	116,614,883	Perda	13	1	1367841	0	45.5	0.001	7
Cromossomo 5										
q35.3	178,308,347	178,431,217	Perda	7	0	122870	0	27.3	0.021	6

Cromossomo 6										
p12.1	55,575,837	57,088,284	Ganho	14	0	1512447	0	27.3	0.021	12
Cromossomo 7										
q34 - q35	142,507,398	145,083,058	Ganho	53	0	2575660	0	27.3	0.021	49
Cromossomo 9										
q22.33 - q31.1	101,336,714	102,707,386	Perda	16	0	1370672	0	27.3	0.021	22
Cromossomo 11										
q23.3	116,794,176	117,769,295	Ganho	27	0	975119	0	27.3	0.021	3
Cromossomo 12										
q13.12	47,784,157	48,273,030	Perda	16	0	488873	0	27.3	0.021	4
Cromossomo 15										
q25.2	81,628,340	81,762,061	Ganho	2	0	133721	0	27.3	0.021	4
q26.1	87,698,017	88,834,350	Ganho	38	1	1136333	0	45.5	0.001	62
q26.1	88,834,350	89,951,446	Ganho	17	0	1117096	0	36.4	0.005	40
q26.1	89,951,446	90,519,028	Ganho	1	0	567582	0	27.3	0.021	15
q26.2	92,412,165	94,536,774	Ganho	5	0	2124609	0	27.3	0.021	22
Cromossomo 17										
q12	33,107,399	33,484,457	Ganho	13	0	377058	0	27.3	0.021	100
Cromossomo 19										
p13.3	4,055,475	4,606,064	Perda	25	0	550589	0	27.3	0.021	43

**Anexo 7 - Alterações genômicas observadas exclusivamente nos pacientes que apresentaram recorrência local ( $P < 0,05$ ).**

Região	Início	Término	Evento	Genes	miRNAs	Tamanho (pb)	Ausência Recorrência (%)	Presença Recorrência (%)	P-Valor	CNV (%)
Cromossomo 1										
p34.3	39,085,424	39,491,570	Perda	8	0	406146	0	33	0.007	13
p34.3 - p34.2	39,491,570	40,676,000	Perda	30	0	1184430	0	27	0.021	47
p34.2	40,676,000	40,995,589	Perda	12	2	319589	0	33	0.007	4
p34.2	40,995,589	41,719,602	Perda	11	1	724013	0	27	0.021	9
p34.1	43,932,338	44,893,103	Perda	21	0	960765	0	27	0.021	41
p34.1	44,893,103	45,410,118	Perda	21	0	517015	0	33	0.007	1
p34.1 - p33	46,200,115	46,595,721	Perda	14	0	395606	0	33	0.007	26
p33	46,595,721	47,299,643	Perda	19	0	703922	0	27	0.021	0
p33	47,299,643	48,617,918	Perda	16	0	1318275	0	33	0.007	5
p33 - p32.3	48,617,918	52,916,873	Perda	30	0	4298955	0	27	0.021	11
p32.3 - p32.2	55,010,085	57,694,851	Perda	18	0	2684766	0	27	0.021	13
p32.1	58,764,063	59,908,632	Perda	11	0	1144569	0	27	0.021	20
p31.3	62,659,504	64,496,130	Perda	19	0	1836626	0	27	0.021	4
p31.3	67,920,470	68,507,811	Perda	9	1	587341	0	27	0.021	1
p22.3	87,389,413	87,426,964	Ganho	2	0	37551	0	27	0.021	7
Cromossomo 2										
q11.2	99,290,491	101,190,633	Perda	17	0	1900142	0	27	0.021	31
q11.2 - q12.1	101,939,838	102,203,391	Perda	3	0	263553	0	27	0.021	1
q35	219,544,309	220,163,131	Perda	45	2	618822	0	27	0.021	37
Cromossomo 3										
p23 - p22.3	31,862,943	32,207,626	Perda	3	0	344683	0	33	0.007	15
p22.3	32,207,626	33,138,352	Perda	14	0	930726	0	27	0.021	3
p21.31	50,399,552	50,579,538	Perda	3	0	179986	0	27	0.021	89
p21.1	53,244,699	53,318,057	Perda	3	0	73358	0	27	0.021	40
p14.3	54,499,757	55,253,319	Perda	5	0	753562	0	33	0.007	7
q13.31 - q13.33	117,996,872	121,816,869	Perda	36	1	3819997	0	33	0.007	13
q13.33 - q21.1	121,816,869	124,486,855	Perda	39	0	2669986	0	27	0.021	30

q21.1 - q21.2	124,486,855	126,003,285	Perda	19	0	1516430	0	33	0.007	3
q21.2 - q21.3	126,003,285	129,145,195	Perda	49	1	3141910	0	27	0.021	35
q22.1	134,446,308	135,092,969	Perda	11	0	646661	0	27	0.021	11
q22.2 - q23	136,082,002	141,128,156	Perda	47	0	5046154	0	27	0.021	11
q23	142,280,876	142,791,985	Perda	4	0	511109	0	27	0.021	1
q25.1	151,652,198	152,932,993	Perda	22	0	1280795	0	27	0.021	29
q25.31 - q25.32	157,174,747	158,315,104	Perda	12	0	1140357	0	27	0.021	16
Cromossomo 4										
q22.1	90,090,209	90,958,740	Ganho	8	0	868531	0	40	0.002	89
q22.1	90,958,740	91,013,994	Ganho	2	0	55254	0	33	0.007	0
q22.1 - q22.3	91,013,994	96,325,554	Ganho	17	0	5311560	0	27	0.021	38
Cromossomo 6										
p24.3	8,027,396	8,999,134	Perda	9	0	971738	0	33	0.007	7
p24.3 - p24.1	8,999,134	11,725,064	Perda	35	0	2725930	0	27	0.021	13
q15	90,487,712	91,217,587	Ganho	6	0	729875	0	27	0.021	7
q23.3	137,293,562	138,321,910	Perda	11	0	1028348	0	40	0.002	22
q24.1	139,788,850	140,347,066	Perda	5	0	558216	0	27	0.021	9
q24.2	143,718,949	144,550,147	Perda	16	0	831198	0	27	0.021	24
q24.2	144,550,147	145,112,541	Perda	2	0	562394	0	33	0.007	43
q24.2 - q24.3	145,112,541	146,858,787	Perda	13	0	1746246	0	27	0.021	12
q24.3	146,858,787	147,828,965	Perda	11	0	970178	0	33	0.007	8
q24.3 - q25.1	147,828,965	149,558,238	Perda	7	0	1729273	0	27	0.021	36
q25.1	149,558,238	151,364,432	Perda	27	0	1806194	0	33	0.007	25
q25.1	151,364,432	151,695,605	Perda	4	0	331173	0	40	0.002	52
q25.2	154,435,081	155,290,712	Perda	8	0	855631	0	47	0.001	12
q25.2 - q25.3	155,290,712	158,422,966	Perda	15	1	3132254	0	53	0.000	45
q25.3	158,422,966	159,065,883	Perda	11	0	642917	0	47	0.001	24
q25.3	159,065,883	160,130,329	Perda	20	0	1064446	0	40	0.002	39
q25.3	160,130,329	160,194,411	Perda	4	0	64082	0	47	0.001	37
q25.3 - q26	160,194,411	163,472,725	Perda	19	0	3278314	0	40	0.002	77
q26 - q27	163,472,725	164,493,952	Perda	8	0	1021227	0	47	0.001	21
q27	164,493,952	165,587,653	Perda	1	0	1093701	0	40	0.002	38
q27	165,587,653	166,057,078	Perda	2	0	469425	0	47	0.001	25

q27	166,057,078	167,660,747	Perda	24	1	1603669	0	40	0.002	37
q27	167,660,747	167,693,112	Perda	2	0	32365	0	33	0.007	100
q27	167,693,112	168,100,501	Perda	8	0	407389	0	40	0.002	100
q27	168,100,501	170,899,992	Perda	30	0	2799491	0	33	0.007	56
Cromossomo 11										
p15.4	6,716,182	7,721,588	Perda	22	1	1005406	0	27	0.021	6
q14.2	85,821,666	86,339,619	Perda	6	0	517953	0	27	0.021	2
Cromossomo 15										
q11.2	20,632,169	20,922,457	Perda	13	0	290288	0	27	0.021	100
q11.2	20,922,457	21,327,440	Perda	11	0	404983	0	33	0.007	100
q11.2	21,327,440	22,547,792	Perda	10	0	1220352	0	27	0.021	76
q21.1	46,708,649	47,525,736	Perda	13	0	817087	0	27	0.021	5
q21.1	47,525,736	47,567,746	Perda	2	0	42010	0	33	0.007	30
q21.1 - q21.2	47,567,746	48,331,227	Perda	6	0	763481	0	27	0.021	22
q21.2 - q21.3	48,567,714	51,890,948	Perda	83	2	3323234	0	27	0.021	37
q22.31	63,748,050	64,302,913	Perda	6	0	554863	0	27	0.021	36
q23	67,131,365	68,759,212	Perda	22	1	1627847	0	27	0.021	34
q24.1	70,810,513	71,303,840	Perda	6	0	493327	0	27	0.021	21
q24.1	71,303,840	71,633,350	Perda	3	0	329510	0	33	0.007	2
q24.1	71,633,350	71,758,379	Perda	3	0	125029	0	27	0.021	1
q26.2 - q26.3	94,536,774	98,386,864	Ganho	39	1	3850090	0	27	0.021	29
q26.3	98,386,864	100,338,915	Ganho	113	1	1952051	0	33	0.007	91
Cromossomo 17										
q22	51,171,684	51,974,829	Ganho	4	0	803145	0	27	0.021	5
q24.1	60,145,570	60,380,124	Ganho	6	0	234554	0	47	0.001	93
q24.1 - q24.2	60,380,124	64,596,211	Ganho	47	3	4216087	0	40	0.002	30
q24.2 - q24.3	64,596,211	64,652,435	Ganho	2	0	56224	0	47	0.001	15
q24.3	64,652,435	64,804,361	Ganho	6	0	151926	0	40	0.002	1
q25.1	71,656,555	71,810,019	Ganho	6	0	153464	0	47	0.001	61
q25.1 - q25.2	71,810,019	72,512,743	Ganho	34	1	702724	0	40	0.002	20

Cromossomo 18										
p11.32	0	846,102	Perda	12	0	846102	0	33	0.007	45
p11.32	846,102	1,010,248	Perda	1	0	164146	0	40	0.002	5
p11.32 - p11.31	2,768,487	3,182,363	Perda	6	0	413876	0	33	0.007	0
p11.31	3,182,363	4,227,567	Perda	14	0	1045204	0	27	0.021	49

**Anexo**

**8 - Alterações genômicas observadas exclusivamente nos pacientes que foram a óbito pela doença (câncer) ( $P < 0,05$ ).**

Região	Início	Término	Evento	Genes	miRNAs	Tamanho (pb)	Pacientes vivos (%)	Pacientes mortos (%)	P-Valor	CNV (%)
Cromossomo 2										
p21 - p16.2	47,364,140	53,897,357	Perda	27	1	6533217	0	31	0.011	30
p13.2 - p13.1	73,346,965	74,480,931	Perda	27	0	1133966	0	23	0.037	60
p13.1	74,671,887	74,719,139	Perda	1	0	47252	0	23	0.037	0
p13.1	74,719,139	74,931,771	Perda	4	0	212632	0	31	0.011	62
q37.3	241,884,224	242,951,149	Ganho	27	0	1066925	0	38	0.003	64
Cromossomo 3										
p21.2 - p21.1	51,684,554	51,950,958	Ganho	9	0	266404	0	23	0.037	1
p21.1	51,950,958	51,959,903	Ganho	2	0	8945	0	31	0.011	0
p21.1	52,422,942	52,482,201	Ganho	4	0	59259	0	31	0.011	53
p21.1	52,482,201	52,548,448	Ganho	7	0	66247	0	23	0.037	1
Cromossomo 4										
q23	99,469,380	99,591,904	Perda	1	0	122524	0	23	0.037	24
Cromossomo 7										
q11.23	76,106,489	77,139,056	Perda	11	0	1032567	0	23	0.037	58
Cromossomo 8										
p21.3	21,948,620	22,536,659	Ganho	25	1	588039	0	23	0.037	100

Cromossomo 9										
p13.1	38,192,385	39,276,464	Perda	13	0	1084079	0	31	0.011	88
q21.33	87,345,175	87,828,514	Perda	6	0	483339	0	23	0.037	67
q22.2 - q22.32	92,509,656	96,011,804	Perda	61	3	3502148	0	23	0.037	19
q22.33 - q31.1	101,336,714	102,707,386	Perda	16	0	1370672	0	23	0.037	22
Cromossomo 10										
q24.32	103,908,672	104,392,647	Ganho	22	1	483975	0	23	0.037	4
Cromossomo 11										
p15.4	3,134,599	3,621,472	Ganho	15	0	486873	0	23	0.037	98
p13	34,041,802	35,685,596	Ganho	15	0	1643794	0	23	0.037	54
p11.2	47,584,541	47,879,909	Perda	6	0	295368	0	23	0.037	20
q23.3	116,794,176	117,769,295	Ganho	27	0	975119	0	23	0.037	3
Cromossomo 12										
q13.13	48,426,777	48,819,846	Perda	23	0	393069	0	23	0.037	4
q13.13	48,819,846	49,130,891	Perda	7	1	311045	0	31	0.011	6
q21.1 - q21.2	72,902,436	75,601,637	Ganho	17	0	2699201	0	23	0.037	9
Cromossomo 15										
q23	66,325,169	68,090,767	Ganho	27	0	1765598	0	23	0.037	43
Cromossomo 17										
q11.2	23,719,032	24,060,379	Ganho	23	0	341347	0	23	0.037	1
Cromossomo 21										
q22.3	41,742,842	42,301,579	Ganho	11	0	558737	0	23	0.037	13

**Anexo 9** - Análise comparativa das alterações genômicas detectadas entre os *cluster 1* versus *clusters 2* ( $P < 0,05$ ).

Região cromossômica	Início (pb)	Término (pb)	Evento	Genes	miRNAs	Tamanho (Kb)	Frequência <i>Cluster 1</i> (%)	Frequência <i>Cluster 2</i> (%)	P-Valor
<b>Cromossomo 1</b>									
p36.33	0	2.208.384	Ganho	146	5	2208.4	0	50.0	0.008
p36.33 - p36.32	2.208.384	2.689.845	Ganho	18	0	481.5	0	56.25	0.003
p36.32	2.689.845	3.356.322	Ganho	8	0	666.5	0	50.0	0.008
p36.23	7.979.723	8.210.697	Ganho	2	0	231.0	0	50.0	0.008
p36.23 - p36.22	8.210.697	9.289.264	Ganho	16	1	1078.6	0	56.25	0.003
p36.22	10.551.849	11.228.674	Ganho	13	0	676.8	9.1	62.5	0.008
p36.13	16.217.396	16.619.945	Ganho	13	0	402.5	9.1	62.5	0.008
q21.2	148.838.061	149.236.666	Ganho	11	0	398.6	0	50.0	0.008
q21.3	150.028.990	150.071.589	Ganho	4	0	42.6	0	50.0	0.008
q21.3	151.256.551	151.345.357	Ganho	5	0	88.8	0	50.0	0.008
q21.3	151.345.357	151.440.060	Ganho	4	0	94.7	0	56.25	0.003
q21.3	151.440.060	151.856.750	Ganho	19	0	416.7	0	62.5	0.001
q21.3	151.856.750	152.286.856	Ganho	25	0	430.1	0	56.25	0.003
q21.3	152.286.856	152.467.522	Ganho	8	1	180.7	0	50.0	0.008
q22	154.387.590	154.476.720	Ganho	5	0	89.1	0	56.25	0.003
q22 - q23.1	154.476.720	155.177.798	Ganho	42	2	701.1	0	50.0	0.008
<b>Cromossomo 2</b>									
q31.3	180.764.589	182.370.149	Perda	8	0	1605.6	0	50.0	0.008
<b>Cromossomo 4</b>									
q35.2	190.619.560	191.273.063	Perda	7	0	653.5	0	50.0	0.008
<b>Cromossomo 5</b>									
p15.33	453.064	1.358.505	Ganho	28	0	905.4	18.2	68.75	0.018

Cromossomo 7									
p22.3	919.644	1.554.157	Ganho	20	1	634.5	9.1	62.5	0.008
Cromossomo 9									
q33.3	126.400.897	126.669.726	Ganho	11	2	268.8	0	50.0	0.008
q33.3	129.244.337	129.284.384	Ganho	4	0	40.0	0	50.0	0.008
q33.3 - q34.11	129.284.384	130.004.976	Ganho	38	0	720.6	0	62.5	0.001
q34.11	130.004.976	130.655.259	Ganho	33	2	650.3	0	56.25	0.003
q34.11	130.655.259	130.732.566	Ganho	4	0	77.3	0	50.0	0.008
Cromossomo 10									
q24.32	103.910.797	104.348.381	Perda	22	1	437.6	54.5	0	0.002
Cromossomo 11									
p15.5	0	1.177.920	Ganho	75	1	1177.9	0	56.25	0.003
p15.5	1.177.920	1.326.762	Ganho	7	0	148.8	0	50.0	0.008
q21	93.533.875	93.800.415	Perda	5	0	266.5	0	50.0	0.008
q13.1	65.798.308	66.296.450	Ganho	31	0	498.1	9.1	62.5	0.008
Cromossomo 16									
p13.3	714.211	1.062.920	Ganho	22	1	348.7	0	50.0	0.008
p13.3	1.062.920	1.341.725	Ganho	14	0	278.8	0	56.25	0.003
p13.3	1.341.725	1.765.678	Ganho	24	0	424.0	0	50.0	0.008
p13.3	3.393.635	3.538.737	Ganho	11	0	145.1	0	50.0	0.008
p13.3	3.538.737	3.783.466	Ganho	9	0	244.7	0	56.25	0.003
p13.3	3.783.466	4.287.660	Ganho	7	0	504.2	0	62.5	0.001
p13.3	4.287.660	4.441.584	Ganho	7	0	153.9	0	56.25	0.003
p13.3	4.441.584	4.586.470	Ganho	5	0	144.9	0	50.0	0.008
p13.3	4.701.725	5.102.148	Ganho	21	0	400.4	0	50.0	0.008
p13.12 - p13.11	14.529.712	15.003.830	Ganho	19	0	474.1	0	50.0	0.008

---

Cromossomo 17

p13.3	0	784.934	Perda	15	0	784.9	91	12.5	0.008
p13.3	784.934	864.248	Perda	3	0	79.3	91	0	0.001
p13.3	836.343	1.527.890	Ganho	16	0	691.5	0	50.0	0.008
p13.3	864.248	1.609.588	Perda	21	1	745.3	82	0	0.001
p13.3	1.591.469	2.545.301	Ganho	27	2	953.8	0	50.0	0.008
p13.3	1.609.588	1.851.779	Perda	4	0	242.2	82	6.25	0.001
p13.3	1.851.779	3.473.279	Perda	46	3	1621.5	82	0	0.001
p13.3 - p13.2	3.473.279	4.630.692	Perda	34	0	1157.4	73	0	0.007
p13.2	4.184.681	4.224.821	Ganho	1	0	40.1	0	50.0	0.008
p13.2	4.224.821	4.269.536	Ganho	0	0	44.7	0	56.25	0.003
p13.2	4.269.536	4.815.087	Ganho	34	0	545.6	0	62.5	0.001
p13.2	4.630.692	4.735.946	Perda	8	0	105.3	73	6.25	0.006
p13.2	4.735.946	5.097.540	Perda	35	0	361.6	64	6.25	0.002
p13.2	4.815.087	4.978.408	Ganho	14	0	163.3	0	56.25	0.003
p13.2 - p13.1	5.097.540	6.865.672	Perda	42	2	1768.1	64	12.5	0.011
p13.1	6.865.672	7.428.080	Perda	55	1	562.4	64	6.25	0.002
p13.1	7.076.125	7.275.859	Ganho	25	0	199.7	0	50.0	0.008
p13.1	7.428.080	7.496.964	Perda	8	0	68.9	73	6.25	0.001
p13.1	7.496.964	7.515.225	Perda	3	0	18.3	82	6.25	0.001
p13.1	7.515.225	7.523.959	Perda	3	0	8.7	82	12.5	0.001
p13.1	7.523.959	7.534.134	Perda	3	0	10.2	64	12.5	0.011
p13.1	7.591.789	7.956.138	Perda	24	0	364.3	64	12.5	0.011
p13.1	8.145.296	8.827.670	Perda	17	0	682.4	64	6.25	0.002

Cromossomo 18

q22.1	60.272.594	62.076.169	Perda	1	0	1803.6	0	50.0	0.008
q22.1	63.591.087	64.594.674	Perda	4	0	1003.6	0	50.0	0.008

q22.1 - q22.2	64.594.674	64.944.845	Perda	2	0	350.2	0	56.25	0.003
q22.2 - q22.3	64.944.845	67.146.790	Perda	5	0	2201.9	0	50.0	0.008
q22.3	67.146.790	68.335.918	Perda	3	0	1189.1	0	56.25	0.003
q22.3	68.335.918	69.432.210	Perda	7	0	1096.3	0	50.0	0.008
Cromossomo 19									
p13.3	2.044.403	2.428.892	Ganho	26	1	384.5	18.2	68.75	0.018
p13.3	6.202.423	6.727.433	Ganho	25	1	525.0	9.1	62.5	0.008
p13.2	7.983.508	8.943.313	Ganho	30	0	959.8	9.1	62.5	0.008
p13.2	8.943.313	9.830.373	Ganho	31	0	887.1	9.1	68.75	0.005
p13.2	9.830.373	10.237.913	Ganho	18	0	407.5	9.1	75.0	0.001
p13.2	10.237.913	10.369.451	Ganho	11	0	131.5	18.2	75.0	0.006
p13.2	10.426.633	10.878.043	Ganho	23	3	451.4	27.3	81.25	0.014
p13.2	11.239.653	11.621.002	Ganho	25	0	381.3	18.2	75.0	0.006
p13.2	11.621.002	12.511.586	Ganho	34	0	890.6	9.1	62.5	0.008
p13.2 - p13.13	12.511.586	12.631.697	Ganho	5	0	120.1	9.1	68.75	0.005
p13.13	12.631.697	12.669.310	Ganho	7	0	37.6	9.1	75.0	0.001
p13.13	12.669.310	12.697.533	Ganho	2	0	28.2	18.2	75.0	0.006
p13.12	14.452.266	14.496.063	Ganho	3	0	43.8	18.2	68.75	0.018
p13.12	14.496.063	14.559.485	Ganho	6	1	63.4	9.1	68.75	0.005
p13.12	14.559.485	14.665.317	Ganho	4	0	105.8	9.1	62.5	0.008
p13.12 - p13.11	15.111.733	16.315.582	Ganho	79	1	1203.8	9.1	62.5	0.008
p13.11	17.782.518	18.156.865	Ganho	13	0	374.3	9.1	62.5	0.008
p13.11	18.156.865	18.176.256	Ganho	3	0	19.4	9.1	68.75	0.005
p13.11	18.176.256	18.881.916	Ganho	30	0	705.7	9.1	75.0	0.001
p13.11	18.881.916	18.995.287	Ganho	7	0	113.4	9.1	68.75	0.005
p13.11	18.995.287	19.468.757	Ganho	20	1	473.5	9.1	62.5	0.008

---



---

Cromossomo 20

---

p11.23	19.419.239	20.097.191	Ganho	9	0	678.0	0	50.0	0.008
p11.23 - p11.22	20.097.191	21.307.843	Ganho	12	0	1210.7	0	56.25	0.003
q11.21	29.352.138	31.439.848	Ganho	64	1	2087.7	9.1	75.0	0.001
q11.21 - q11.22	31.439.848	33.010.662	Ganho	32	1	1570.8	9.1	68.75	0.005
q11.22	33.010.662	33.141.804	Ganho	5	1	131.1	9.1	75.0	0.001
q11.22 - q11.23	33.141.804	34.526.443	Ganho	40	1	1384.6	0	75.0	0.002
q11.23	34.526.443	34.835.664	Ganho	10	0	309.2	0	68.75	0.004
q11.23	34.835.664	36.459.110	Ganho	28	0	1623.4	0	75.0	0.002
q11.23	36.459.110	36.524.327	Ganho	9	0	65.2	0	68.75	0.004
q11.23	36.524.327	36.954.602	Ganho	8	0	430.3	0	62.5	0.001
q11.23 - q12	36.954.602	37.848.337	Ganho	4	0	893.7	0	56.25	0.003
q12	37.848.337	40.217.625	Ganho	16	0	2369.3	0	50.0	0.008
q12 - q13.12	40.217.625	41.778.418	Ganho	11	0	1560.8	0	56.25	0.003
q13.12	41.778.418	42.579.204	Ganho	21	0	800.8	0	62.5	0.001
q13.12	42.579.204	42.969.094	Ganho	11	0	389.9	0	56.25	0.003
q13.12	42.969.094	43.027.003	Ganho	7	0	57.9	0	50.0	0.008
q13.12	43.851.264	43.868.407	Ganho	2	0	17.1	0	50.0	0.008
q13.12	43.868.407	44.014.138	Ganho	14	0	145.7	0	56.25	0.003
q13.12	44.014.138	44.030.493	Ganho	2	0	16.4	0	50.0	0.008
q13.12 - q13.13	44.798.386	49.060.434	Ganho	51	3	4262.0	0	50.0	0.008
q13.13 - q13.2	49.060.434	49.463.303	Ganho	2	0	402.9	0	56.25	0.003
q13.2	49.463.303	52.545.297	Ganho	15	0	3082.0	0	62.5	0.001
q13.2	52.545.297	53.703.942	Ganho	1	0	1158.6	0	56.25	0.003
q13.2 - q13.31	53.703.942	54.759.395	Ganho	12	0	1055.5	0	62.5	0.001
q13.31 - q13.32	54.759.395	56.653.991	Ganho	25	0	1894.6	0	56.25	0.003
q13.32 - q13.33	56.653.991	59.003.189	Ganho	36	3	2349.2	0	50.0	0.008

q13.33	59.003.189	59.628.687	Ganho	1	0	625.5	0	56.25	0.003
q13.33	59.628.687	59.716.309	Ganho	1	0	87.6	0	68.75	0.004
q13.33	59.716.309	59.868.446	Ganho	2	0	152.1	0	75.0	0.002
q13.33	59.868.446	60.055.651	Ganho	4	1	187.2	0	81.25	0.003
q13.33	60.055.651	60.236.430	Ganho	8	0	180.8	0	87.5	0.006
q13.33	60.236.430	60.374.551	Ganho	6	0	138.1	0	93.75	0.001
q13.33	60.374.551	61.137.054	Ganho	32	2	762.5	0	100.0	0.008
q13.33	61.137.054	61.645.574	Ganho	28	1	508.5	0.0	93.75	0.007
q13.33	61.645.574	61.684.607	Ganho	4	0	39.0	0.0	81.25	0.003
q13.33	61.684.607	61.834.699	Ganho	9	0	150.1	0.0	75.0	0.002
q13.33	61.834.699	62.198.449	Ganho	32	5	363.8	0.0	68.75	0.004
q13.33	62.198.449	62.207.788	Ganho	2	0	9.3	0.0	56.25	0.003
q13.33	62.207.788	62.435.964	Ganho	7	0	228.2	0.0	50.0	0.008

**Anexo 10 - Análise comparativa das alterações genômicas detectadas entre os *cluster 2* versus *clusters 3* ( $P < 0,05$ ).**

Região cromossômica	Início (pb)	Término (pb)	Evento	Genes	miRNAs	Tamanho(Kb)	Frequência Cluster 2 (%)	Frequência Cluster 3 (%)	P-Valor
<b>Cromossomo 1</b>									
p36.22	10.551.849	11.228.674	Ganho	13	0	676.8	62.5	10.0	0.014
p36.13	16.217.396	16.619.945	Ganho	13	0	402.5	62.5	10.0	0.014
<b>Cromossomo 9</b>									
q33.3	126.400.897	126.669.726	Ganho	11	2	268.8	50.0	0.0	0.009
<b>Cromossomo 11</b>									
q13.1	65.902.541	65.975.701	Ganho	2	0	73.2	62.5	10.0	0.014
q13.1	65.975.701	66.296.450	Ganho	17	0	320.7	62.5	0.0	0.003
q13.1	66.296.450	66.361.467	Ganho	1	0	65.0	56.2	0.0	0.004
q13.1	66.361.467	66.712.607	Ganho	11	0	351.1	50.0	0.0	0.009
q21	93.533.875	93.825.370	Perda	5	0	291.5	50.0	0.0	0.009

q21	94.490.005	94.578.828	Perda	4	0	88.8	56.2	0.0	0.004
q21	94.578.828	94.596.824	Perda	1	0	18.0	50.0	0.0	0.009
q21	94.596.824	94.823.941	Perda	1	0	227.1	56.2	0.0	0.004
<b>Cromossomo 13</b>									
q12.11 - q12.12	21.665.807	22.803.408	Perda	6	0	1137.6	62.5	10.0	0.014
q12.12 - q12.2	22.803.408	27.084.272	Perda	48	0	4280.9	68.7	10.0	0.005
q12.2 - q12.3	27.084.272	27.884.470	Perda	12	0	800.2	62.5	10.0	0.014
q13.1 - q13.3	32.617.223	34.789.127	Perda	3	0	2171.9	62.5	10.0	0.014
q13.3	36.348.124	38.654.477	Perda	18	0	2306.4	62.5	10.0	0.014
q13.3 - q14.11	38.654.477	41.573.929	Perda	31	2	2919.5	68.7	10.0	0.005
q14.11	41.573.929	42.491.395	Perda	7	0	917.5	62.5	10.0	0.014
q14.3	50.515.686	51.335.903	Perda	14	0	820.2	62.5	10.0	0.014
q14.3	51.335.903	52.184.798	Perda	16	0	848.9	62.5	0.0	0.003
q14.3 - q21.1	52.184.798	52.562.685	Perda	5	0	377.9	56.2	0.0	0.004
q21.1	52.562.685	53.129.655	Perda	0	0	567.0	62.5	0.0	0.003
q21.1 - q21.2	53.129.655	58.957.227	Perda	12	1	5827.6	56.2	0.0	0.004
q21.2	58.957.227	59.900.295	Perda	6	0	943.1	62.5	0.0	0.003
q21.2 - q21.32	59.900.295	64.689.767	Perda	10	0	4789.5	68.7	0.0	0.001
q21.32	64.689.767	64.922.644	Perda	0	0	232.9	68.7	10.0	0.005
q21.32	66.919.644	67.001.782	Perda	0	0	82.1	75.0	20.0	0.014
q21.33	68.022.881	68.547.396	Perda	3	0	524.5	75.0	20.0	0.014
q21.33	68.547.396	68.817.103	Perda	0	0	269.7	75.0	10.0	0.004
q21.33	68.817.103	68.951.128	Perda	0	0	134.0	68.7	10.0	0.005
q21.33	68.951.128	70.158.392	Perda	2	0	1207.3	75.0	10.0	0.004
q21.33	70.158.392	70.731.154	Perda	0	0	572.8	81.2	10.0	0.001
q21.33	70.731.154	71.085.070	Perda	1	0	353.9	87.5	10.0	0.001
q21.33	71.085.070	71.446.445	Perda	1	0	361.4	93.7	10.0	0.001
q21.33 - q22.1	71.446.445	72.346.100	Perda	8	0	899.7	87.5	10.0	0.001

q22.1	72.346.100	72.381.168	Perda	1	0	35.1	81.2	10.0	0.001
q22.1	72.381.168	72.512.620	Perda	1	0	131.5	75.0	10.0	0.004
q22.1 - q22.2	72.512.620	75.071.366	Perda	13	0	2558.7	68.7	10.0	0.005
q22.2	75.071.366	75.790.142	Perda	5	0	718.8	62.5	10.0	0.014
q31.1	78.903.340	82.641.359	Perda	4	0	3738.0	62.5	10.0	0.014
q31.1 - q31.3	84.756.600	89.811.736	Perda	7	1	5055.1	62.5	10.0	0.014
q32.3	98.164.651	99.550.513	Perda	19	1	1385.9	62.5	10.0	0.014
q32.3 - q33.1	100.088.039	103.432.373	Perda	27	0	3344.3	62.5	10.0	0.014
<b>Cromossomo 14</b>									
q23.1	57.189.048	57.342.218	Perda	1	0	153.2	50.0	0.0	0.009
<b>Cromossomo 16</b>									
p13.3	3.783.466	4.287.660	Ganho	7	0	504.2	62.5	10.0	0.014
<b>Cromossomo 17</b>									
p13.3	836.343	1.527.890	Ganho	16	0	691.5	50.0	0.0	0.009
p13.3	1.591.469	2.189.293	Ganho	20	2	597.8	50.0	0.0	0.009
p13.2	4.269.536	4.557.422	Ganho	9	0	287.9	62.5	10.0	0.014
p13.2	4.906.914	4.978.408	Ganho	8	0	71.5	56.2	0.0	0.004
p13.1	7.552.132	7.758.156	Ganho	14	0	206.0	50.0	0.0	0.009
p13.1	7.758.156	7.956.138	Ganho	13	0	198.0	56.2	0.0	0.004
p13.1	7.956.138	8.170.371	Ganho	23	0	214.2	62.5	0.0	0.003
p13.1	8.170.371	8.219.743	Ganho	3	0	49.4	56.2	0.0	0.004
<b>Cromossomo 20</b>									
q11.21	29.352.138	31.347.779	Ganho	62	1	1995.6	75.0	20.0	0.014
q11.21	31.347.779	31.439.848	Ganho	4	0	92.1	75.0	10.0	0.004
q11.21 - q11.22	31.439.848	32.455.012	Ganho	18	0	1015.2	68.7	10.0	0.005
q11.22 - q11.23	33.010.662	34.526.443	Ganho	44	2	1515.8	75.0	20.0	0.014
q11.23	34.835.664	36.459.110	Ganho	28	0	1623.4	75.0	20.0	0.014
q13.33	59.868.446	60.024.242	Ganho	4	1	155.8	81.2	30.0	0.015

**Anexo 11** - Análise comparativa das alterações genômicas detectadas entre os *cluster 1* versus *clusters 3* ( $P < 0,05$ ).

Região cromossômica	Início (pb)	Término (pb)	Evento	Genes	miRNAs	Tamanho(Kb)	Frequência Cluster 3 (%)	Frequência Cluster 1 (%)	P-Valor
<b>Cromossomo 10</b>									
q24.32	104.648.690	104.763.597	Perda	3	0	114.9	10	64	0.023
<b>Cromossomo 11</b>									
p15.5	510.172	1.326.762	Ganho	52	1	816.6	50	0	0.012
<b>Cromossomo 13</b>									
q14.3 - q21.2	51.335.903	59.162.686	Perda	34	1	7826.8	0	73	0.001
q21.2 - q21.32	59.162.686	64.689.767	Perda	15	0	5527.1	0	64	0.004
q12.11	18.601.703	19.524.227	Perda	12	0	922.5	10	64	0.023
q12.13	25.476.570	25.512.855	Perda	1	0	36.3	10	64	0.023
q12.13 - q12.3	25.512.855	27.884.470	Perda	26	0	2371.6	10	73	0.008
q12.3 - q13.3	30.768.181	34.946.352	Perda	31	0	4178.2	10	73	0.008
q13.3 - q14.11	34.946.352	39.854.438	Perda	47	0	4908.1	10	64	0.023
q14.11	39.854.438	41.515.239	Perda	26	2	1660.8	10	73	0.008
q14.11	41.515.239	42.491.395	Perda	7	0	976.2	10	82	0.002
q14.3	50.515.686	51.335.903	Perda	14	0	820.2	10	73	0.008
q21.32	64.689.767	64.922.644	Perda	0	0	232.9	10	64	0.023
q21.33	68.547.396	69.358.344	Perda	1	0	810.9	10	73	0.008
q21.33	69.358.344	69.471.502	Perda	1	0	113.2	10	64	0.023
q12.3	27.884.470	30.768.181	Perda	26	0	2883.7	20	73	0.030
q14.11 - q14.2	42.491.395	47.919.163	Perda	51	0	5427.8	20	82	0.009
q14.2	47.919.163	48.743.022	Perda	8	0	823.9	20	73	0.030
q14.2 - q14.3	48.743.022	49.480.922	Perda	18	0	737.9	20	82	0.009
q14.3	49.480.922	49.489.529	Perda	3	0	8.6	20	73	0.030
q14.3	49.489.529	50.515.686	Perda	29	2	1026.2	20	82	0.009
q21.32 - q21.33	66.482.964	68.547.396	Perda	4	0	2064.4	20	73	0.030

<b>Cromossomo 16</b>									
p13.3	664.186	1.341.725	Ganho	42	1	677.5	50	0	0.012
p13.3	1.345.938	1.528.584	Ganho	11	0	182.6	50	0	0.012
<b>Cromossomo 17</b>									
p13.3	0	864.248	Perda	17	0	864.2	0	91	0.001
p13.3	864.248	1.566.749	Perda	20	1	702.5	0	82	0.001
p13.3	2.189.293	3.473.279	Perda	31	1	1284.0	0	82	0.001
p13.3 - p13.2	3.473.279	4.735.946	Perda	41	0	1262.7	0	73	0.001
p13.2 - p13.1	4.735.946	7.428.080	Perda	132	3	2692.1	0	64	0.004
p13.1	7.428.080	7.496.964	Perda	8	0	68.9	0	73	0.001
p13.1	7.496.964	7.523.959	Perda	4	0	27.0	0	82	0.001
p13.1	7.523.959	7.956.138	Perda	28	0	432.2	0	64	0.004
p13.1	7.956.138	8.145.296	Perda	22	0	189.2	0	55	0.012
p13.1	8.145.296	8.827.670	Perda	17	0	682.4	0	64	0.004
p13.1	8.827.670	9.065.800	Perda	1	0	238.1	0	55	0.012
p13.3	1.566.749	2.189.293	Perda	21	2	622.5	10	82	0.002
<b>Cromossomo 19</b>									
p13.3	3.009.167	4.772.795	Ganho	71	2	1763.6	60	91	0.023
p13.2	9.858.188	10.237.913	Ganho	18	0	379.7	60	91	0.023
<b>Cromossomo 20</b>									
q13.33	60.208.686	60.218.313	Ganho	2	0	9.6	50	0	0.012
q13.33	62.173.539	62.435.964	Ganho	11	0	262.4	50	0	0.012
q13.33	60.218.313	60.374.551	Ganho	7	0	156.2	60	0	0.004
q13.33	61.684.607	62.173.539	Ganho	37	5	488.9	60	0	0.004
q13.33	60.374.551	61.684.607	Ganho	59	3	1310.1	70	0	0.001

**Anexo 12 - Resultados da análise do número de cópias do DNA nas amostras de SPI (16) e LMS (11) avaliados pela metodologia de qPCR.**

	CCND1_P1	CCND1_P2	ARNT_P1	ARNT_P2	ARNT_P3	PBXIP1_P2	PBXIP1_P1	SLC27A3
N1	1.029	1.187	0.990	0.939	0.891	0.918	0.924	0.811
N2	1.059	1.091	1.090	1.111	1.147	1.142	1.220	1.083
N3	1.139	1.100	0.939	1.168	1.077	1.047	1.163	1.057
N4	0.930	1.038	1.040	0.930	0.975	1.001	1.019	1.034
N5	1.070	0.962	1.054	1.070	1.025	0.999	0.981	0.966
N6	1.010	1.008	1.129	1.025	1.090	1.066	1.050	0.978
N7	1.084	1.132	1.212	1.151	1.179	1.110	1.123	1.109
N8	1.106	1.138	1.014	0.977	0.940	1.063	1.113	1.019
N9	1.023	1.036	0.971	1.080	1.569	1.015	0.921	1.151
N10	1.117	1.188	0.977	1.089	1.100	1.014	1.156	0.975
LM4	0.856	0.828	1.412	1.518	1.618	1.257	1.267	1.303
LM7	1.215	1.459	1.528	3.199	2.715	1.271	0.536	1.903
LM15	1.006	0.991	1.146	1.180	1.250	0.989	0.893	1.093
LM16	0.937	0.939	0.921	0.966	0.958	0.945	0.914	0.969
LM18	2.187	0.916	0.488	1.900	2.337	2.198	1.176	2.126
LM19	0.769	0.769	0.592	0.712	0.788	0.930	0.873	0.826
LM20	0.683	0.671	0.755	0.727	0.778	0.753	0.755	0.703
LM21	0.913	0.985	1.041	1.015	1.033	1.019	0.988	0.976
LM22	0.854	0.657	0.201	0.781	0.885	1.057	0.523	0.764
LM23	0.910	0.860	0.991	1.008	1.026	1.044	1.078	1.016
LM24	0.839	0.853	0.899	0.898	0.938	0.906	0.852	0.877
SP1	0.945	1.031	0.779	1.091	1.200	0.980	0.961	1.115
SP2	1.954	2.023	0.908	0.949	1.080	0.888	0.851	1.019
SP3	0.696	0.790	1.195	1.632	1.672	1.071	0.829	1.435
SP4	1.013	0.980	1.092	1.242	1.464	1.002	0.861	1.532
SP7	0.509	0.489	1.522	1.453	1.561	1.376	1.441	1.385
SP8	0.725	1.138	1.685	1.781	1.971	1.124	1.158	1.270
SP9	1.144	1.168	2.844	2.653	2.951	2.352	2.356	2.306
SP13	1.209	0.999	0.509	1.180	1.468	1.528	1.020	1.103
SP14	1.041	0.969	0.928	1.034	1.258	1.104	1.081	1.048
SP15	0.804	0.760	0.914	0.785	0.903	0.770	0.902	0.833

SP16	0.853	0.760	0.455	1.141	1.391	1.212	0.897	1.018
SP18	0.875	0.906	1.090	1.048	1.128	1.080	0.995	1.113
SP20	1.370	1.381	0.984	1.485	1.828	1.487	1.158	1.634
SP21	1.089	1.105	0.887	2.168	2.108	1.786	1.038	1.911
SP22	1.352	1.362	1.136	1.155	1.272	1.182	0.947	1.273
SP23	0.715	0.570	0.503	1.356	1.461	1.391	0.814	1.224

Legenda:

Número de cópias (Ploidia DNA)	Valores correspondentes
0N	0.100
1N	0.550
2N	no intervalo
3N	1.350
4N	1.850