

**A.C.CAMARGO CANCER CENTER
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE**

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS,
GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM SARCOMAS UTERINOS: IMPACTO DA
ANÁLISE INTEGRADA PARA O DIAGNÓSTICO E SUA APLICABILIDADE
NA PRÁTICA CLÍNICA.**

ANA CAROLINA DE JESUS PANIZA

Tese de Doutorado, apresentada à
Fundação Antônio Prudente como
requisito para obtenção do título de Doutor
em Ciências da Saúde. Área de
concentração: Oncologia.

Orientadora: Dra. Louise de Brot

São Paulo

2025

Paniza , Ana Carolina de Jesus .

**INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS,
GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM SARCOMAS UTERINOS:
IMPACTO DA ANÁLISE INTEGRADA PARA O DIAGNÓSTICO E SUA
APLICABILIDADE NA PRÁTICA CLÍNICA.. / Ana Carolina de Jesus
Paniza . São Paulo, 2025.**

89f.

**Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de
Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.**

Orientador: Dra. Louise de Brot.

1. Sarcoma uterino, 2. Fusão gênica, 3. Metilação

CDU 616

Nome: Ana Carolina de Jesus Paniza

Título: INVESTIGAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS,
GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM SARCOMAS UTERINOS: IMPACTO DA
ANÁLISE INTEGRADA PARA O DIAGNÓSTICO E SUA APLICABILIDADE NA
PRÁTICA CLÍNICA.

Aprovado em: 03/11/2025

Banca Examinadora

Orientadora: Louise De brot

Instituição: Fundação Antonio Prudente

Membro da banca: Glauco Baiocchi Neto

Instituição: Fundação Antonio Prudente

Membro da banca: Giovana Tardin Torrezan

Instituição: Fundação Antonio Prudente

Membro da banca: Alexandre Andre Balieiro Anastacio da Costa

Instituição: Fundação Antonio Prudente

Membro da banca: Gustavo Rubino Focchi

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

RESUMO

Paniza ACJ. Investigação das Alterações Anatomopatológicas, Genéticas e Epigenéticas em Sarcomas Uterinos: Impacto da Análise Integrada para o Diagnóstico e sua Aplicabilidade na Prática Clínica. [Tese - Doutorado]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2025.

Introdução: Os sarcomas uterinos são neoplasias raras, heterogêneas e de difícil diagnóstico. Avanços recentes em tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) permitiram a identificação de múltiplas alterações moleculares, especialmente fusões gênicas, ampliando a classificação desses tumores e revelando que seu espectro ainda não está completamente caracterizado (1,2). Considerando a correlação entre características histológicas e perfis moleculares, postula-se a existência de fusões gênicas ainda não descritas. Nesse contexto, o diagnóstico integrado, que associa dados clínicos, morfológicos e moleculares, pode definir subgrupos mais precisos de sarcomas uterinos (3). **Objetivos:** Caracterizar clinicamente, histopatologicamente e molecularmente amostras de sarcomas uterinos diagnosticados no Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center (São Paulo, Brasil), entre 2014 e 2024, visando identificar biomarcadores com relevância diagnóstica, prognóstica e potencial terapêutico. **Metodologia:** Foram analisadas amostras fixadas em formol e embebidas em parafina, além de material congelado. Para detecção de fusões gênicas foi utilizado o painel TruSight RNA Fusion (Illumina, EUA), abrangendo 507 genes relacionados ao câncer. O perfil de metilação e a análise de variação de número de cópias (CNV) foi avaliado pelo Infinium MethylationEPIC (Illumina, EUA). Utilizou-se o teste de qui-quadrado de Pearson, complementado pelo teste exato de Fisher para análise estatística. **Resultados:** Foram incluídos 51 casos, sendo 24 leiomiossarcomas (LMS) uterinos (47,1%), 18 sarcomas do estroma endometrial (SEE) de baixo grau (35,3%) e 9 de alto grau (17,6%). Fusões gênicas foram identificadas em 38% dos casos, incluindo seis rearranjos que ainda não foram descritos na literatura. Três casos de LMS uterino apresentaram as fusões novas *COL1A2::COL1A1*; *RUNX1::ABCA10* e *CLTC::TANC2*. Além das fusões clássicas já descritas nessas entidades, dois casos de SEE de baixo grau apresentaram as fusões *PHF1::SPAG1* e *RNF8::CUX1*, e um caso de SEE de

alto grau apresentou a fusão *CIITA::BCOR*. O perfil de metilação reclassificou quatro casos de LMS uterino em sarcoma indiferenciado. Observou-se diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevida global e livre de progressão, com piores taxas para as pacientes diagnosticadas em estagio clínico avançado (III e IV). Essas pacientes apresentam tumor genomicamente instável, com vários pontos de ganho e perda cromossômicos. Tumores com fusão oncogênica detectada e sem instabilidade cromossômica, foram relacionados com melhores fatores clínicos, com maior taxa de sobrevida global e livre de progressão.

Conclusão: A caracterização molecular e epigenética demonstrou impacto diagnóstico e prognóstico nos sarcomas uterinos. Esses achados reforçam a importância de investigações adicionais voltadas à identificação de novos biomarcadores capazes de refinar o diagnóstico, orientar estratégias terapêuticas e potencialmente modificar a prática clínica.

Palavras-chave: Sarcoma uterino. Fusão gênica. Rearranjo. Metilação.

ABSTRACT

Paniza ACJ. Pathological, Genetic and Epigenetic Alterations in Uterine Sarcomas: The Impact of Integrated Analysis on Diagnosis and Clinical Practice. [Tese - Doutorado]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2025.

Introduction: Uterine sarcomas are rare, heterogeneous neoplasms that frequently pose diagnostic challenges. Recent advances in next-generation sequencing (NGS) technologies have enabled the identification of multiple molecular alterations, particularly gene fusions, expanding the classification of these tumors and revealing that their spectrum remains incompletely characterized (1,2). Considering the correlation between histological features and molecular profiles, it is hypothesized that novel, as yet undescribed gene fusions may exist. In this context, integrated diagnosis—combining clinical, morphological, and molecular data—may allow for more precise subclassification of uterine sarcomas (3). **Objectives:** To clinically, histopathologically, and molecularly characterize uterine sarcomas diagnosed at the Department of Pathology, A.C. Camargo Cancer Center (São Paulo, Brazil), between 2014 and 2024, with the aim of identifying biomarkers with diagnostic, prognostic, and therapeutic relevance. **Methods:** Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and frozen tissue samples were analyzed. Gene fusions were assessed using the TruSight RNA Fusion Panel (Illumina, USA), covering 507 cancer-related genes. DNA methylation profiling and copy number variation (CNV) analysis were performed with the Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina, USA). Statistical analyses were conducted using Pearson's chi-square test, complemented by Fisher's exact test when appropriate. **Results:** A total of 51 cases were included: 24 uterine leiomyosarcomas (LMS; 47.1%), 18 low-grade endometrial stromal sarcomas (LG-ESS; 35.3%), and 9 high-grade endometrial stromal sarcomas (HG-ESS; 17.6%). Gene fusions were identified in 38% of cases, including six rearrangements not previously reported in the literature. Novel fusions in LMS included *COL1A2::COL1A1*, *RUNX1::ABCA10*, and *CLTC::TANC2*. In addition to classical fusions described in these entities,

two LG-ESS harbored *PHF1::SPAG1* and *RNF8::CUX1*, while one HG-ESS presented *CIITA::BCOR*. The methylation profiling reclassified four cases of uterine leiomyosarcoma as undifferentiated sarcoma. A statistically significant difference was observed in both overall survival and progression-free survival, with worse outcomes among patients diagnosed at advanced clinical stages (III and IV). These patients exhibited genomically unstable tumors, characterized by multiple chromosomal gains and losses. In contrast, tumors harboring oncogenic gene fusions and lacking chromosomal instability were associated with more favorable clinical features, including higher overall survival and progression-free survival rates. **Conclusions:** Molecular and epigenetic characterization demonstrated diagnostic and prognostic impact in uterine sarcomas. These findings underscore the importance of further investigations aimed at identifying novel biomarkers capable of refining diagnosis, guiding therapeutic strategies, and potentially transforming clinical practice.

Keywords: Uterine sarcoma. Gene fusion. Rearrangement. Methylation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Contexto.....	10
1.2 Leiomiossarcoma uterino.....	13
1.3 Sarcoma do estroma endometrial de baixo grau	14
1.4 Sarcoma do estroma endometrial de alto grau.....	16
1.5 Sarcomas uterinos na era da medicina de precisão.....	17
1.6 Papel das fusões no câncer.....	21
1.6.1 Tipos e mecanismos de fusões	22
1.6.2 Classificação funcional das fusões	24
1.7 Perfil de metilação - Uma nova ferramenta diagnóstica para sarcomas	26
1.8 Técnicas Moleculares	28
1.8.1 Estudo imunohistoquímico.....	29
1.8.2 Sequenciamento de nova geração (NGS)	32
1.9 Justificativa do Estudo	34
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 Geral	36
2.2 Específicos.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Amostras.....	37
3.2 Metodologias.....	37
3.2.1 Painel NGS para fusões gênicas.....	37
3.2.1.1 Etapas técnicas.....	38
3.2.3 Perfil de Metilação	44
3.2.3.1 Etapas técnicas.....	45
5. DESENVOLVIMENTO	52
6. RESULTADOS.....	52
6.1 Dados sócio-demográficos, anatomopatológicos e clínicos	52

6.2 <i>Análise estatística</i>	56
6.3 <i>Achados Moleculares e epigenéticos por grupo diagnóstico</i>	62
7. <i>Discussão</i>	71
8. <i>Conclusão</i>	78
9. <i>Referências</i>	79

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contexto

Os sarcomas, grupo de neoplasias malignas de origem mesenquimal, compreendem uma ampla gama de tumores raros, que podem surgir em qualquer localização anatômica, incluindo o útero, e exibem um espectro notável de características histológicas e clínicas. Mesmo dentro de um único histotipo, há variações morfológicas significativas, o que pode dificultar ainda mais o diagnóstico. Além disso, malignidades não sarcomatosas podem mimetizar sarcomas do ponto de vista histológico, complicando o diagnóstico diferencial e exigindo uma abordagem cuidadosa, mesmo em centros especializados. Neste contexto, os sarcomas uterinos representam um campo complexo e, frequentemente, controverso dentro da patologia(1,3,4).

Historicamente, os tumores mesenquimais uterinos foram classificados principalmente como neoplasias do músculo liso ou do estroma endometrial, com base em critérios morfológicos, perfis imunohistoquímicos e/ou análises realizadas por hibridização in situ fluorescente (FISH). No entanto, o rápido avanço das tecnologias moleculares, particularmente o sequenciamento de nova geração (NGS), permitiu a identificação de alterações genômicas específicas em muitos sarcomas. Essas alterações, como certas fusões gênicas, muitas vezes são definidoras da doença ou até mesmo exclusivas de um determinado subtipo de sarcoma, fornecendo informações valiosas para o diagnóstico e o manejo clínico (5).

Apesar desse progresso, a crescente diversidade de subtipos de sarcomas, associada à grande variedade de tumores não sarcomatosos frequentemente incluídos no diagnóstico diferencial histológico, representam um desafio significativo. Mesmo painéis gênicos direcionados podem falhar em capturar plenamente o panorama genômico necessário para diagnosticar e manejar adequadamente essas neoplasias. Essa limitação é ainda mais evidente nos sarcomas uterinos, cuja classificação e compreensão continuam em evolução. Embora avanços tenham expandido a categorização molecular e histológica desses tumores, é evidente que o amplo espectro de sarcomas uterinos ainda

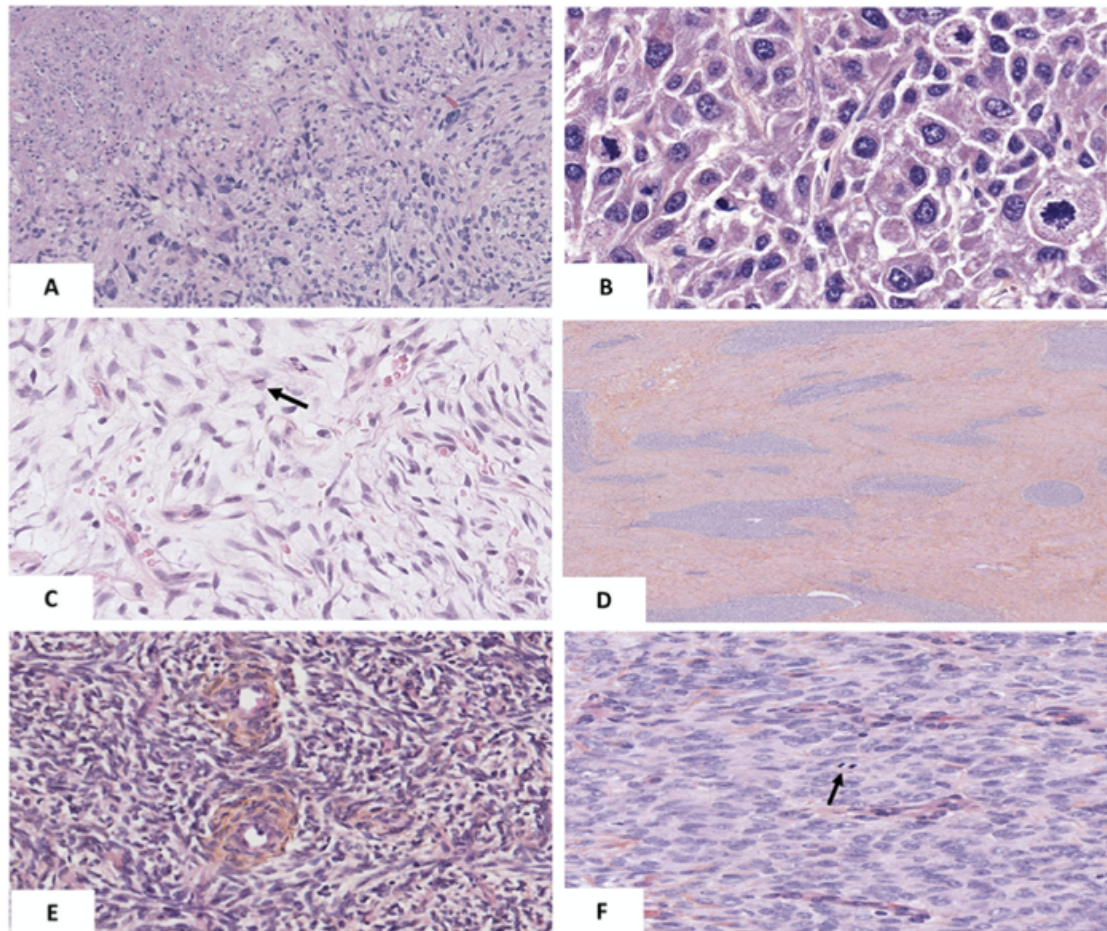
não foi completamente elucidado, refletindo a necessidade contínua de pesquisa para aprimorar as ferramentas diagnósticas e as abordagens terapêuticas.

Este cenário ressalta a importância crítica de um diagnóstico preciso e integrado, que combine a análise morfológica tradicional com técnicas moleculares avançadas, a fim de otimizar o cuidado ao paciente e avançar no conhecimento sobre essas neoplasias desafiadoras.

A classificação mais recente dos sarcomas uterinos requer uma combinação de características morfológicas, imuno-histoquímicas e moleculares. A identificação de biomarcadores nessas neoplasias tem papel preditivo de resposta a terapia alvo, e sua adequada caracterização traz grandes impactos no tratamento oncológico (1).

Os sarcomas uterinos representam 8% dos casos de câncer do corpo uterino, sendo o Leiomiossarcoma e o sarcoma do estroma endometrial (SEE) os mais comuns. Leiomiossarcomas representam 63% dos sarcomas uterinos. SEE representam 21% dos casos e são divididos em baixo grau e alto grau. Sarcoma uterino indiferenciado e os adenossarcomas representam 6% dos casos, respectivamente (4). A figura 1 mostra características histopatológicas dos dois tipos de sarcomas mais comuns do útero.

Figura 1- Fotomicrografia de Sarcomas uterinos



Fonte: Croce S et al. Uterine sarcomas and rare uterine mesenchymal tumors with malignant potential. Diagnostic guidelines of the French Sarcoma Group and the Rare Gynecological Tumors Group. *Gynecol Oncol.* 2022;167(2):373–89. (4).

Legenda: (A)Leiomiossarcoma fusiforme: células fusiformes com atipia pleomórfica difusa, necrose e mitose. (B)Leiomiossarcoma epitelióide: células com núcleos redondos, nucléolos proeminentes e citoplasma eosinofílico abundante, presença de atipia difusa e mitoses. (C)Leiomiossarcoma mixóide: atipia difusa e mitoses. (D e E)Sarcoma do estroma endometrial de baixo grau: Infiltração difusa na parede miometrial. Atipia de baixo grau, lembrando um endométrio em fase proliferativa, vasculatura arterioliiforme. (F) Sarcoma do estroma endometrial de alto grau com YWHAE::FAM22: células ovóides, atipia acentuada e alta contagem mitótica.

Há ainda outros sarcomas considerados raros nesta topografia:

- PEComa (Perivascular Epithelioid Cell tumor)
- Sarcoma uterino com perda de *SMARCA4*
- Rabdomyosarcoma
- Sarcoma uterino com rearranjo de *NTRK*
- Sarcoma uterino com rearranjo *COL1A1::PDGFB*
- UTROSCT (Uterine Tumors resembling to ovarian sex cord tumor)
- Tumor miofibroblástico inflamatório

1.2 Leiomiossarcoma uterino

O Leiomiossarcoma uterino (LMS) é o subtipo mais comum entre os sarcomas uterinos, representando cerca de 40–50% desses tumores, embora corresponda apenas a 1–2% de todas as neoplasias malignas uterinas(6). Costuma ocorrer em pacientes com idade superior a 50 anos e, na maioria dos casos, origina-se no corpo uterino, sendo que aproximadamente 5% têm origem no colo uterino. Pode apresentar localização intramural (dois terços dos casos), submucosa ou subserosa. As manifestações clínicas incluem sangramento vaginal, massa pélvica ou dor pélvica/abdominal, e sintomas gastrointestinais ou urinários podem estar presentes devido à disseminação regional. Em casos mais raros, a apresentação inicial pode ocorrer por ruptura tumoral (hemoperitônio) ou metástases pulmonares(6). Síndromes paraneoplásicas e manifestações hematológicas são incomuns nesse histotipo tumoral.

A etiologia do Leiomiossarcoma uterino não é bem estabelecida, embora haja relatos ocasionais de associação com uso de tamoxifeno e irradiação pélvica prévia(7,8). Alterações moleculares descritas incluem aberrações cromossômicas complexas, numéricas e estruturais, sem um marcador patognomônico específico(2,9,10). Entre os genes mais frequentemente mutados estão *TP53*, em cerca de 30% dos casos, *ATRX*, em cerca de 25% dos casos e *MED12*, em cerca de 20% dos casos (11,12) .

Apesar de ser considerada uma neoplasia genomicamente complexa, o LMS uterino não possui um evento iniciador bem estabelecido. A presença dos transcritos de fusão envolvendo os genes *PLAG1* e *PGR* pode ser útil para

identificar alguns casos de LMS mixoide e epitelióide, respectivamente. Entretanto, a ausência desses biomarcadores não exclui o diagnóstico de LMS uterino (13,14).

Macroscopicamente, o LMS uterino caracteriza-se normalmente como uma massa única, de consistência carnosa, dimensões variadas, podendo ser necrótica e hemorrágica. Cerca de 25% dos tumores medem menos de 5 cm.

Histologicamente, três subtipos principais são reconhecidos: fusocelular, epitelióide e mixoide. O diagnóstico de LMS fusocelular requer dois dos seguintes critérios: necrose tumoral, atipia citológica significativa e ≥ 4 mitoses/mm² (≥ 10 mitoses/10 campos de grande aumento de 0,55 mm de diâmetro e 0,24 mm² de área). O subtipo epitelióide é definido pela presença de mais de 50% de células arredondadas ou poligonais com atipia moderada a significativa e/ou necrose tumoral ou $\geq 1,6$ mitoses/mm², enquanto o subtipo mixoide geralmente é paucicelular, com estroma mixoide abundante e diagnóstico sugerido pela presença de atipia significativa, necrose tumoral e raras mitoses (15–19).

As células tumorais expressam desmina, caldesmon e actina de músculo liso (SMA), com expressão variável de CD10, EMA e citoqueratinas, especialmente no subtipo epitelióide. A expressão de receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR) é comum no subtipo fusocelular, enquanto a superexpressão de p16 e/ou p53 é frequente (20,21).

O prognóstico do LMS uterino é desfavorável, mesmo quando a doença está restrita ao útero no momento do diagnóstico inicial. Tumores menores que 5 cm e confinados ao útero têm melhor prognóstico. A taxa global de sobrevida em 5 anos para todos os estágios varia de 15% a 25%, enquanto tumores em estádios I–II apresentam sobrevida de 40–70%. A resposta à quimioterapia é geralmente limitada (22–24).

1.3 Sarcoma do estroma endometrial de baixo grau

O sarcoma do estroma endometrial (SEE) de baixo grau é um tumor que acomete predominantemente o corpo uterino, sendo rara sua ocorrência no colo.

Clinicamente, manifesta-se com sangramento uterino anormal, dor pélvica, massa uterina e, ocasionalmente, metástases pulmonares, anexiais ou linfonodais. Pode afetar mulheres em ampla faixa etária, com idade média de 52 anos (16–83 anos). Fatores de risco incluem uso prolongado de estrogênio ou tamoxifeno e irradiação pélvica prévia (25–29)

A etiologia permanece desconhecida, mas alterações moleculares desempenham papel central na patogênese dos SEE de baixo grau. Em cerca de 70% dos casos é possível identificar uma fusão gênica envolvendo membros da família polycomb, sendo *JAZF1::SUZ12* a mais comum, seguida por *JAZF1::PHF1*, *EPC1::PHF1* e *MEAF6::PHF1*. Fusões menos frequentes incluem *MBTD1::EZH1* (CXorf67), *BRD8::PHF1*, *EPC2::PHF1* e *EPC1::SUZ12*, documentadas em menos de três casos cada, sendo *BRD8::PHF1* também descrita em tumores de alto grau (30–37).

É importante ressaltar que a presença desses transcritos de fusão não permite diferenciar o nódulo estromal do SEE de baixo grau. Nestes casos, apenas a avaliação histopatológica das bordas do tumor possibilita o diagnóstico diferencial adequado (1,38).

Macroscopicamente, o SEE de baixo grau frequentemente apresenta nódulos intracavitários ou intramiometriais mal delimitados, de coloração amarelada a castanha, medindo entre 5–10 cm, com infiltração miometrial evidente e, por vezes, trombos tumorais intravasculares, particularmente em vasos do paramétrio (25).

Microscopicamente, caracteriza-se por ilhas celulares densas e irregulares que penetram o miométrio de forma difusa, frequentemente associadas a invasão linfovascular. As células tumorais exibem núcleos ovais a fusiformes, com atipia mínima ou ausente, citoplasma escasso e rede arteriolar delicada. A atividade mitótica é geralmente baixa, mas pode ser aumentada em alguns casos. Podem ainda apresentar variantes que incluem diferenciação em músculo liso, transformação fibromixoide/fibrosa e diferenciação tipo cordão sexual (39).

O perfil imunohistoquímico desses tumores apresenta expressão difusa de CD10, IFITM1, ER e PR, com positividade focal para ciclina D1 e, ocasionalmente, para pan-citoqueratinas. Elementos de diferenciação tipo

músculo liso expressam desmina e h-caldesmon, enquanto áreas tipo cordão sexual podem expressar inibina, calretinina, melan-A, WT1 e CD99 (40,41).

O SEE de baixo grau é um sarcoma relativamente indolente, com curso clínico prolongado mesmo em casos recorrentes. O estadiamento é o principal fator prognóstico: a taxa de sobrevida em 5 anos ultrapassa 90% para tumores em estádios I–II, mas cai para cerca de 50% nos estádios III–IV (42).

1.4 Sarcoma do estroma endometrial de alto grau

O sarcoma do estroma endometrial (SEE) de alto grau é uma neoplasia rara, podendo acometer pacientes de 14 a 71 anos, e sua etiologia permanece desconhecida (43).

Os SEE de alto grau são classificados de acordo com a presença de dois eventos moleculares mutuamente exclusivos: a fusão *YWHAE::NUTM2A* e alterações em *BCOR*. As alterações em *BCOR* podem ser rearranjos envolvendo um gene parceiro, como os já descritos *ZC3H7B::BCOR*, *EP300::BCOR*, *BCOR::LPP*, ou duplicação interna em tandem (ITD) no exon 15 do *BCOR*. Sarcomas com alteração em *BCOR* podem apresentar também amplificação do gene *MDM2* e *CDK4* (1,44,45).

Fusões menos comuns, mas já descritas em SEE de alto grau, incluem *EPC1::BCOR*, *JAZF1::BCORL1* e *BRD8::PHF1* (46–51).

Macroscopicamente, são massas volumosas intracavitárias ou intramiométriais, de coloração amarelada, consistência carnosa, frequentemente com hemorragia e necrose.

Microscopicamente, podem apresentar padrão expansivo ou infiltrativo, frequentemente com invasão linfovascular, alta atividade mitótica e necrose. Tumores com fusão *YWHAE::NUTM2A/B* exibem células arredondadas, citoplasma eosinofílico, núcleos com alto grau de atipia, contornos irregulares, cromatina vesicular e nucléolos evidentes, podendo coexistir com componente de SEE de baixo grau. Diferenciação pseudopapilar, glandular, rabdoide, pseudorosetas e padrões tipo cordão sexual são incomuns (52–55).

O perfil imunohistoquímico inclui positividade para ciclina D1, BCOR, KIT, CD56 e CD99, sendo negativo para DOG1. Tumores com o rearranjo *ZC3H7B::BCOR* apresentam positividade difusa para ciclina D1, cerca de 50% expressam BCOR, e mostram expressão variável de CD10, ER e PR, podendo ser focais para SMA e caldesmon, mas são negativos para desmina. Tumores com *BCOR ITD* costumam ser menos positivos para CD10, mas expressam ciclina D1 e BCOR difusamente, são negativos para ER e PR, e podem expressar desmina, mas são negativos para SMA e caldesmon (56–59).

O SEE de alto grau é um sarcoma agressivo, com prognóstico desfavorável em relação ao SEE de baixo grau. Terapia baseada em antraciclinas pode beneficiar casos recorrentes com fusão *YWHAE::NUTM2A/B* (60).

1.5 Sarcomas uterinos na era da medicina de precisão

O cenário dos sarcomas uterinos, tanto diagnóstico quanto terapêutico, está se tornando cada vez mais complexo, graças à evolução dos testes genômicos e a identificação de alterações moleculares *drivers*, como mutações e novos transcritos de fusão. O intuito de reconhecer essas entidades é refinar os critérios diagnósticos e também personalizar as condutas terapêuticas, pois algumas dessas alterações são passíveis de serem alvo de terapias específicas.

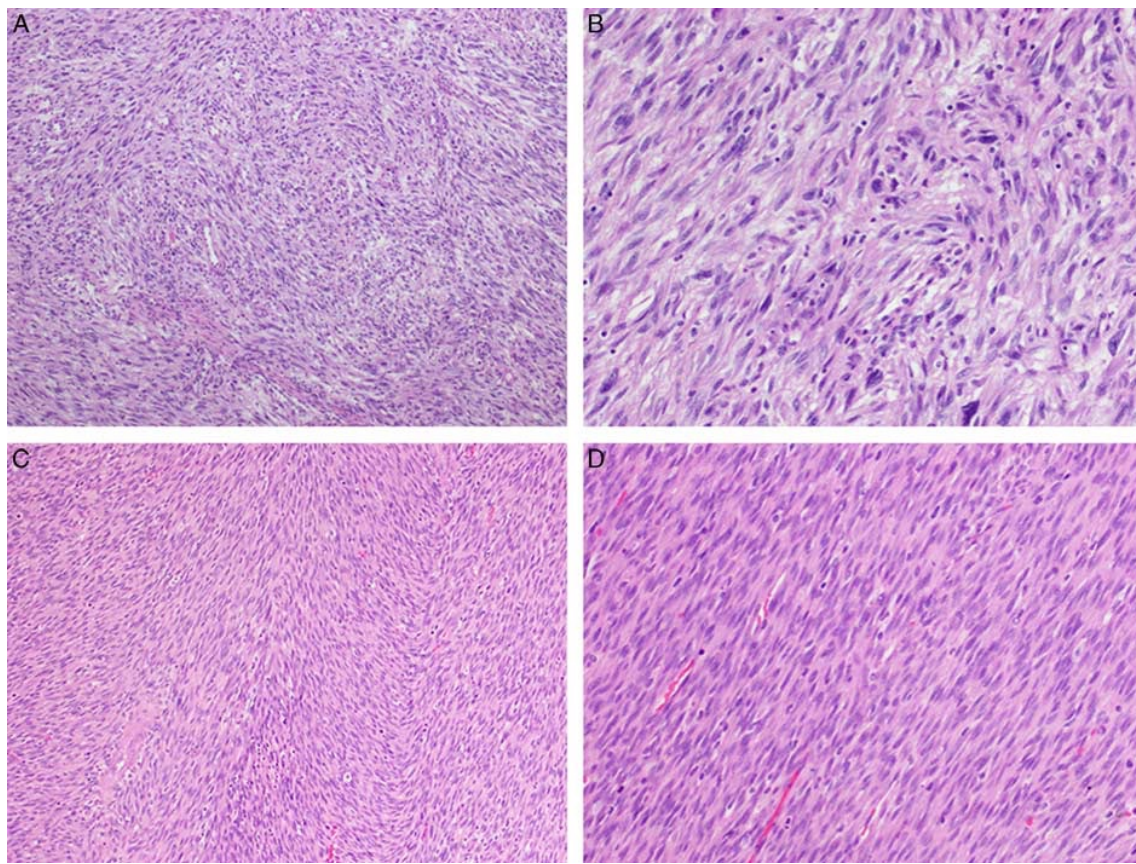
Um bom exemplo desse novo cenário da medicina de precisão são os tumores *NTRK-positivos*. Os sarcomas uterinos com rearranjos de *NTRK*, caracterizados pela primeira vez em 2018 por Chiang e colaboradores, são um grupo recentemente descrito de tumores ginecológicos raros, caracterizados por morfologia de células fusiformes fasciculadas, com expressão imunohistoquímica de S100 e pan-TRK, predominantemente encontrados no colo uterino de mulheres jovens. O achado de uma neoplasia de células fusiformes no colo uterino, com imunohistoquímica negativa para desmina, deve levantar a suspeita de um tumor uterino com rearranjo de *NTRK* (61).

Embora ocorram com mais frequência em mulheres na terceira e quarta décadas de vida, a suspeita também deve ser considerada nos tumores de células fusiformes cervicais em adolescentes e pacientes na pós-menopausa. A

positividade para S100 e CD34, embora não seja necessária, também corrobora o diagnóstico (62).

Histologicamente, os sarcomas uterinos positivos para fusão NTRK consistem em uma densa proliferação de células fusiformes dispostas em padrões de crescimento aleatório, estoriforme ou “em espinha de peixe”. As células têm núcleos de tamanho intermediário, cromatina aglomerada, nucléolos pequenos e citoplasma eosinofílico abundante. A atipia nuclear é geralmente leve a moderada, embora casos raros possam demonstrar pleomorfismo acentuado. A vascularização pode ser significativa, com vasos de paredes espessas ou finas, delicada e ocasionalmente hemangiopericitomatosa. A presença de linfócitos infiltrantes é variável. Necrose tumoral pode ser observada. O índice mitótico pode variar de 1 a 50 figuras de mitose por 10 campos de grande aumento, com mediana de 7 (63). Alguns exemplos podem ser vistos na figura 2, abaixo.

Figura 2: Fotomicrografia de sarcoma uterino, NTRK-positivo.



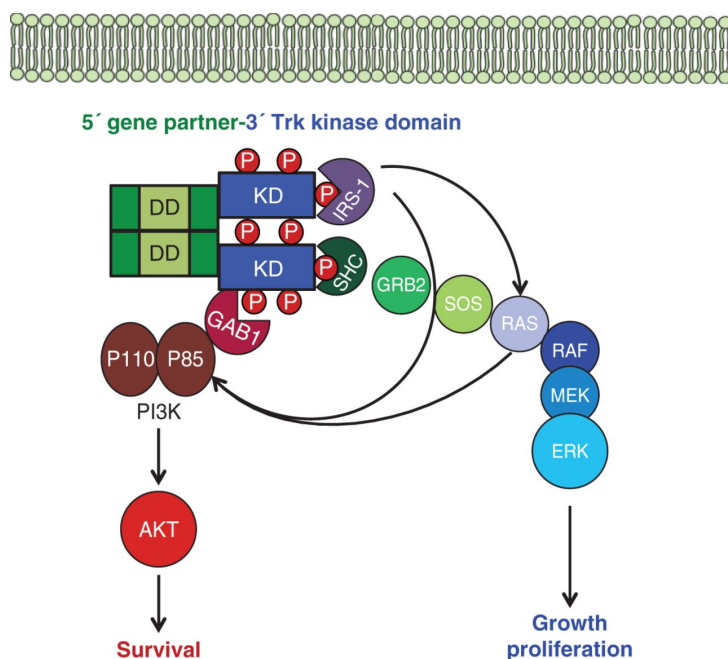
Fonte: Chiang S et al. S100 and pan-trk staining to report NTRK fusion-positive uterine sarcoma: Proceedings of the ISGyP companion society session at the 2020 USCAP annual meeting. Int J Gynecol Pathol. 2021;40(1):24–7 (10).

Os rearranjos de NTRK são eventos oncogênicos encontrados em uma ampla variedade de neoplasias, sendo elas comuns ou raras, como fibrossarcomas infantis, tumores do sistema nervoso central e sarcomas uterinos. Apesar da baixa frequência, as fusões de *NTRK* foram responsáveis por uma revolução na oncologia, levando à aprovação de uma droga – larotrectinibe – que pode ser utilizada independentemente do tipo histológico tumoral, o que é conhecido como “terapia agnóstica”. A terapia anti-*NTRK* específica tem mostrado grande benefício aos pacientes, pressupondo que mesmo em se tratando de eventos raros, deva-se discutir a pesquisa de alterações em *NTRK* em todos os pacientes (64,65).

São diversos os parceiros de fusão de *NTRK*. Em sua maioria os rearranjos são patogênicos, e conferem sensibilidade a terapias alvo. Nos sarcomas uterinos a

fusão mais frequente é a *TPM3::NTRK1*, presente em mais de 60% dos casos com rearranjo de NTRK, sendo também encontradas as fusões *LMNA::NTRK1*, *TPR::NTRK1*, *RBPMS::NTRK3* e *EML4::NTRK3*. Os pontos de quebra nos genes NTRK podem variar, mas a sequência de codificação completa do domínio tirosina quinase deve permanecer sempre inalterada, com a fusão levando ao aumento da expressão do domínio quinase. Esses genes de fusão demonstraram possuir propriedades oncogênicas, incluindo a indução da proliferação celular e a ativação de vias de sinalização relacionadas ao câncer, como as vias *MAPK* e *PI3K/AKT/mTOR* (Figura 3).

Figura 3: Vias de sinalização envolvidas na fusão de NTRK



Fonte: Vaishnavi A et al. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov.* 2015;5(1): 25–34 (10).

Com uma taxa de recorrência de até 30%, os sarcomas uterinos NTRK-positivos devem ser conduzidos como potencialmente malignos, mesmo sendo considerados como tumor de baixo grau pela WHO 2020 (66–68).

Adicionalmente, além dos sarcomas uterinos com rearranjo de NTRK, outros sarcomas nessa topografia já podem se beneficiar de terapias-alvo direcionadas.

Os sarcomas uterinos apresentando transcritos de fusão envolvendo o gene *ALK*, ou *COL1A1::PDGFB*, são sensíveis a terapia com inibidores específicos, tornando a testagem sistemática extremamente relevante para pacientes com alto risco de recidiva ou nos casos metastáticos (1).

1.6 Papel das fusões no câncer

A fusão de genes representa uma importante classe de alterações somáticas no câncer, com o potencial de criar proteínas quiméricas com funções alteradas. Esses rearranjos podem envolver oncogenes, levando à amplificação de funções oncogênicas, o que ocorre através da superexpressão de proteínas. Podem também levar à inativação de genes supressores de tumor (por exemplo, *TP53*, *PTEN*, *RB1*), o que normalmente é detectado como transcritos de fusão fora do quadro de leitura.

Embora dois tipos de mutação, como uma variante de nucleotídeo único (SNVs) e uma fusão oncogênica, possam ser detectadas no mesmo tumor, é improvável que duas fusões drivers sejam detectadas no mesmo tumor, uma vez que são eventos moleculares mutuamente exclusivos. Certas fusões são marcadores diagnósticos para tipos específicos de câncer, enquanto outras podem ser encontradas em tumores distintos. Por exemplo, *EWSR1::FLI1* é frequentemente detectada no sarcoma de Ewing, e a fusão *DNAJB1::PRKACA* é característica do hepatocarcinoma fibrolamelar. Por outro lado, *FGFR3::TACC3* pode ser encontrada em múltiplos tipos de câncer (69).

Além de influenciar a morfologia do tumor, as fusões gênicas também são eventos definidores de subtipos clínicos em diversos tipos tumorais, pois trazem consigo características prognósticas e preditivas. Certas fusões, como *BCR::ABL1* em pacientes com cromossomo Philadelphia positivo, geralmente

persistem ao longo da vida do tumor e podem funcionar como biomarcadores confiáveis para resultados terapêuticos. Como exemplo, terapias bem estabelecidas, que têm como alvo fusões envolvendo quinases, resultam em respostas rápidas, significativas e muitas vezes duradouras, ressaltando seu papel essencial como eventos motores da doença, e ilustram princípios importantes de desenvolvimento de medicamentos que podem ser aplicados para o direcionamento de fusões que não envolvem proteínas quinases (69,70).

1.6.1 Tipos e mecanismos de fusões

As fusões gênicas podem ocorrer através de múltiplos mecanismos a nível do DNA; é importante ter todos esses conceitos esclarecidos para a melhor interpretação de cada achado. Rearranjo é um termo amplo que descreve qualquer alteração estrutural na organização do material genético dentro do genoma. Isso inclui uma variedade de mudanças, como translocação, inserção, deleção, duplicação em tandem, inversão, cromotripsia e splicing aberrante (71).

Uma translocação é um tipo de rearranjo onde um segmento de DNA é transferido de uma localização cromossômica para outra. Pode ocorrer dentro do mesmo cromossomo (intracromossômica) ou entre dois cromossomos diferentes (intercromossômica). Uma translocação intercromossômica pode ser uma translocação recíproca balanceada, que ocorre quando sequências de DNA são trocadas entre dois cromossomos distintos sem resultar em desequilíbrio entre eles. Em contraste, a translocação intercromossômica não balanceada envolve uma troca desigual de sequências, levando à ausência ou informação genética adicional (70,71).

Uma fusão de genes resulta de um rearranjo genômico que afeta um ou mais genes, resultando em um gene híbrido e transcritos quiméricos, tipicamente compostos de componentes dos 2 genes, que devem ser funcionais. Uma fusão gênica pode envolver mais de 2 genes, e ainda, os transcritos quiméricos podem ser de apenas um gene envolvido. Uma fusão gênica pode surgir de uma deleção de uma região entre dois genes que transcrevem na mesma direção, ou pode

resultar de uma duplicação de uma região genômica, como ocorre na duplicação em tandem (70,71).

Outro tipo de rearranjo cromossômico é a inversão, que ocorre quando seções de cromossomos giram. Isso pode acontecer em relação ao centrômero (inversão pericêntrica) ou não relacionado a ele (inversão paracêntrica). Outra forma de rearranjo é a cromotrisia, que pode envolver um cromossomo, uma região cromossômica, ou múltiplos cromossomos, que são quebrados em vários fragmentos e depois reagrupados de maneira incorreta (70, 71).

Existem ainda dois tipos de rearranjos com papel oncogênico em certos tipos tumorais: a troca de promotor (*promoter swap*) e o sequestro do potencializador (*enhancer hijacking*). Esses rearranjos desencadeiam o chamado "efeito de posição" em oncogenes, levando à sua ativação constitutiva. No rearranjo de troca de promotor, a região promotora regulatória de um gene, se conecta à região codificadora de outro gene, afetando sua expressão. Já no sequestro do potencializador, um rearranjo pode trazer para a proximidade um elemento que potencializa uma sequência, seja a montante ou a jusante de um gene com o qual não está normalmente associado, afetando também sua expressão (70, 71).

Os genes envolvidos em uma fusão oncogênica são referidos como o gene N' (N-terminal) e o gene C' (C-terminal). Com base nos mecanismos de formação de fusões oncogênicas, cinco categorias podem ser consideradas: (i) Fusão Neo-Traducional, que ocorre quando um segmento da região não traduzida (5' UTR) do gene C' é transformado em uma sequência codificante devido a pontos de quebra de DNA, criando efetivamente novas regiões codificantes. (ii) Versão Intrônica, caracterizada por pontos de quebra de DNA que resultam na fusão de um éxon codificante do gene N' com vários éxons codificantes potenciais do gene C', levando a proteínas de fusão ligeiramente diferentes. (iii) Neo-Splicing, ocorre quando os pontos de quebra de DNA interrompem as estruturas típicas de splicing. Para compensar, a célula tumoral pode desenvolver novos locais de splicing ou éxons criptográficos, formando um novo padrão de splicing para reter éxons essenciais. (iv) Fusão de Éxon Quimérico, que envolve pontos de quebra de DNA que conectam diretamente regiões codificantes de ambos os genes N'

e C', formando um éxon híbrido. E (v) Captura de Promotor/Potenciador, que é um evento distinto, como *IGH::CRLF2* na leucemia linfoblástica aguda de linhagem B (B-ALL), onde rearranjos envolvem sequências de promotor ou potenciador que levam à ativação aberrante de um gene alvo que, de outra forma, está silenciado na linhagem normal correspondente do tumor. Especialmente neste cenário, o sequenciamento de DNA é necessário para uma compreensão imparcial, uma vez que a alteração não gera uma proteína quimérica (70, 71).

Essas categorias abrangem combinações potenciais de potenciador/promotor e vários rearranjos intron-exon e exon-exon. Enquanto os tipos neo-traducionais e outros tipos de fusão resultam na síntese de proteínas quiméricas, a captura de potenciador/promotor afeta a regulação gênica sem formar novos produtos proteicos. Neo-splicing e neo-traducional são os tipos mais comuns de mecanismos detectados em pacientes com câncer infantil (70).

1.6.2 Classificação funcional das fusões

As fusões oncogênicas são sistematicamente categorizadas com base em seus mecanismos funcionais de ação, oferecendo insights vitais nos processos moleculares subjacentes ao desenvolvimento e progressão do câncer (71).

Há sete principais categoriais, descritas a seguir (tabela 1).

- Receptores de tirosina quinase: envolve fusões oncogênicas que iniciam a ativação do receptor independente de ligantes. Esses mecanismos levam à sinalização constitutiva, que promove a proliferação celular descontrolada e a sobrevivência celular. Exemplos notáveis incluem *FGFR3::TACC*, *EML4::ALK*, *ETV6::RET*, *NCOA4::RET* e fusões ROS1. Essas fusões, ao contornar os mecanismos regulatórios normais, são os principais alvos para inibidores de tirosina quinase em estratégias terapêuticas (72).

- Receptor não tirosina quinase: exibem ativação constitutiva de vias de sinalização de quinase, independentemente de estímulos externos, levando a sinais de crescimento celular sustentados. *BCR::ABL1*, na leucemia mieloide crônica, e o rearranjo *MAP3K8*, são exemplos clássicos dessa classe (73).

- Fator de transcrição: Fusões como *EWS::FLI1*, *RUNX1::RUNX1T1* e *PML::RARA* resultam em fatores de transcrição oncogênicos que têm interações aberrantes com DNA e cofatores proteicos. Por exemplo, a proteína de fusão EWS-FLI1 pode se ligar a outras sequências e convertê-las em potenciadores funcionais que elevam a transcrição de genes adjacentes (74).

- Moduladores Epigenéticos: Regulam a acessibilidade da cromatina, como as fusões KMT2A, que resultam em alterações na estrutura da cromatina ou modificações de histonas, alterando assim os perfis de expressão gênica. Os rearranjos de KMT2A estão presentes em mais de 70% dos novos diagnósticos de leucemia linfoblástica aguda (LLA) em recém nascidos, 5-6% dos casos pediátricos e 15% dos casos em adultos (75).

- Coativadores/Correpressores: Interrompem a regulação transcricional, como visto nas fusões *CBFB::MYH11* e *CTCF::NCOA3*. Essas alterações podem levar à ativação ou repressão transcricional de genes cruciais, contribuindo para a tumorigenese através de padrões de expressão gênica desequilibrados, como já descritos na leucemia mieloide aguda (LMA) e tumor fibrótico pediátrico de baixo grau (76,77).

- Efeito posicional: Observado em fusões como *IGH::MYC*, *IGH::DUX4* e rearranjos USP6, envolve a regulação positiva da expressão do gene alvo devido à justaposição de um elemento de promotor/potenciador forte. As fusões IGH são distintivas em sua gênese, geralmente surgindo de irregularidades no processo típico de recombinação, quando uma inserção atípica de material genético de uma localização cromossômica diferente ocorre adjacente ao potenciador IGH. Esse fenômeno, conhecido como "*enhancer hijacking*", resulta na superexpressão do gene parceiro, que pode atuar como um iniciador oncogênico, favorecendo a proliferação celular descontrolada e a sobrevivência. Após a tradução de um transcrito de fusão normal, uma proteína quimérica é produzida, enquanto que, nesse mecanismo, o gene translocado nas fusões IGH é superexpresso devido à sua proximidade com o potenciador (78,79).

- Genes supressores: Rearranjos intragênicos em TP53 e RB1, por exemplo, resultam em falhas na regulação dos pontos de checagem do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose, facilitando assim o desenvolvimento do câncer (71,80).

Tabela 1 – Classificação funcional das fusões.

Categoria	Mecanismo	Exemplos
Receptor Tirosina Quinase	Ativação do receptor independente do ligante	<i>FGFR3::TACC</i> , <i>EML4::ALK</i> , <i>ETV6::RET</i> , <i>NCOA4::RET</i> , fusão de ROS1.
Receptor não Tirosina Quinase	Ativação constitutiva da via de sinalização	<i>BCR::ABL1</i> , rearranjo de MAP3K8.
Fator de transcrição	Desregulação da transcrição	<i>EWS::FLI1</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i> , <i>PML::RARA</i> .
Moduladores epigenéticos	Alteração da estrutura da cromatina ou nas histonas	Fusão de KMT2A
Coativadores/Correpressores	Corregulação transcricional alterada	<i>CBFB::MYH11</i> , <i>CTCF::NCOA3</i>
Efeito posicional	Aumento da expressão do gene alvo	<i>IGH::MYC</i> , <i>IGH::DUX4</i> , rearranjo de USP6.
Supressores tumorais	Perda da função supressora (transcritos out-of-frame)	TP53, rearranjo intragênico de RB1

Fonte: Autoria própria.

1.7 Perfil de metilação - Uma nova ferramenta diagnóstica para sarcomas

Recentemente, muitos estudos têm mostrado a relevância clínica do uso do perfil de metilação para o diagnóstico e classificação dos sarcomas de pequenas

células redondas e azuis. Para muitos desses tumores, que não se enquadram em um diagnóstico histológico definitivo, o perfil de metilação consegue reclassificá-los e agrupá-los em classes de entidades já estabelecidas de sarcoma. Além disso, a classificação baseada na metilação do DNA já demonstra potencial diagnóstico para a subtipagem de sarcomas de tecidos moles e ossos (81).

A metilação é a modificação epigenética do DNA humano mais extensivamente estudada. Sua ação nos resíduos de citosina do DNA ocorre principalmente nas sequências CpG e tem sido caracterizada como um importante mecanismo regulador da função do genoma. Há muito se sabe sobre seu papel crucial no desenvolvimento embrionário, na transcrição, na estabilidade cromossômica e na inativação do cromossomo X. O perfil de metilação do DNA é frequentemente induzido por fatores relacionados à idade, fatores ambientais, nutricionais e por patógenos, como vírus (82).

A metilação do DNA desempenha papéis importantes tanto no desenvolvimento normal das células quanto em diferentes tipos de doenças. Durante o desenvolvimento embrionário, células imaturas passam por diferenciação ao alterar a atividade de transcrição de genes específicos por meio de mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA. Os padrões de metilação específicos da linhagem celular são mantidos durante a divisão celular, incluindo durante a tumorigênese. Portanto, os padrões de metilação dos promotores das células cancerígenas refletem as propriedades da população original de células precursoras. Embora também existam mudanças na metilação do DNA adquiridas somaticamente durante o desenvolvimento do câncer, os perfis originais se sobressaem. Esses fatores contribuem para um padrão de metilação de promotor específico da entidade tumoral (83).

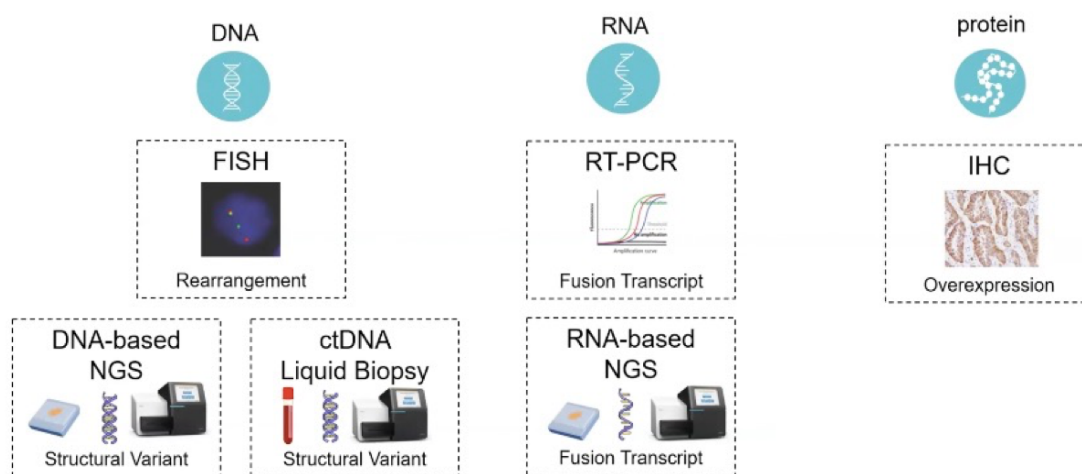
No câncer, além dos padrões de metilação do DNA refletirem o tipo celular de origem, é possível avaliar as alterações adquiridas durante a formação do tumor. Estudos de perfis de metilação em tumores cerebrais humanos demonstraram assinaturas específicas de cada entidade, levando à identificação de diversos subtipos novos e clinicamente relevantes. Pesquisas recentes demonstram que essa técnica molecular pode também ser de grande valor no diagnóstico dos sarcomas (82).

Um estudo recente, utilizando uma cohort de leiomiossarcoma advindos da base de dados do TCGA-SARC, buscou avaliar as diferenças epigenéticas e transcriptômicas existentes entre leiomiossarcoma uterino (n=27) e leiomiossarcoma (n=53) de partes moles não uterino. O estudo evidenciou diferentes perfis de metilação do DNA existentes entre esses dois grupos, sugerindo que esses perfis epigenéticos diferenciais estão associados aos subtipos de LMS e podem ser responsáveis pelas diferenças observadas nos resultados clínicos. Além disso, foram identificados vários genes diferencialmente expressos e vias especificamente associadas a cada um dos grupos. Esses achados sugerem que os perfis epigenéticos podem ser usados para estratificar pacientes e aplicar agentes terapêuticos direcionados aos mecanismos epigenéticos para o manejo de LMS, além de orientar o desenvolvimento de biomarcadores ou terapias direcionadas (84)

1.8 Técnicas Moleculares

As fusões gênicas podem ser detectadas através de diversas técnicas moleculares, sendo que cada uma delas apresenta suas limitações e vantagens. A começar pelo tipo de molécula avaliada, na figura abaixo (Figura 4) é possível notar que cada uma das principais técnicas atualmente utilizadas se baseia em moléculas distintas para a detecção de fusões gênicas.

Figura 4 - Diferentes métodos para detecção de fusão gênica



Fonte: Marchiò C et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. Ann Oncol. 2019;30(9):1417–27 (14).

1.8.1 Estudo imunohistoquímico

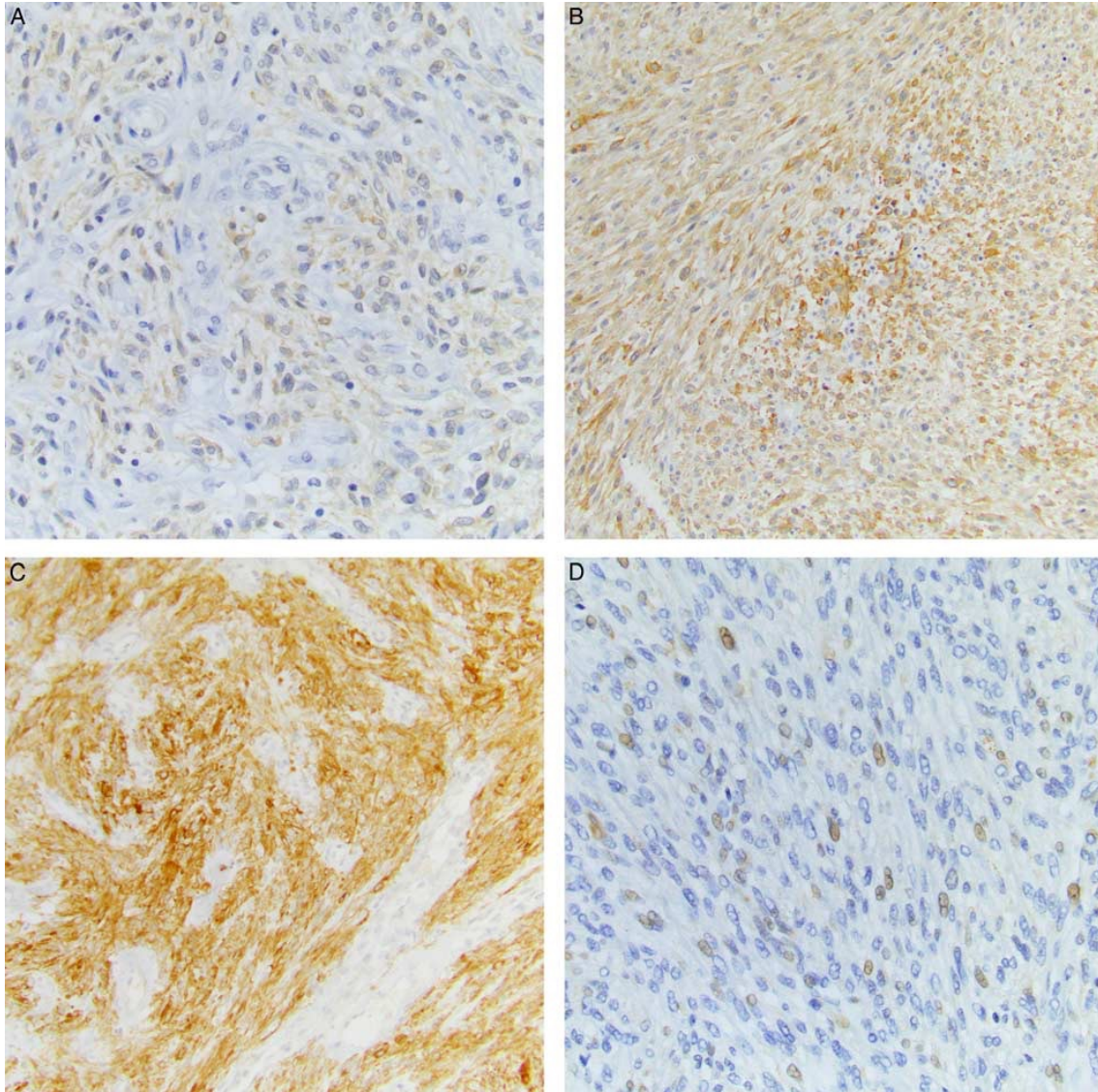
O estudo imunohistoquímico pode ser a primeira ferramenta auxiliar na classificação dos sarcomas uterinos, que podem expressar actina de músculo liso focalmente, mas são negativos para desmina, receptor de estrógeno (RE) e receptor de progesterona (RP). Os padrões de coloração de CD34 e S100 podem variar, de acordo com a literatura (85).

Com o intuito de aumentar o acesso à detecção de pacientes com tumores que possuem alterações alvo, numerosos estudos têm demonstrado que a imunohistoquímica pode ser uma ferramenta de triagem efetiva para vários tipos tumorais, que antes só eram diagnosticados com testes menos disponíveis na maioria dos laboratórios, como a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ou o sequenciamento de nova geração (NGS) (86).

Testes utilizando anticorpo pan-Trk são úteis na detecção de fusões nos genes NTRK1 e NTRK2 com alta sensibilidade, porém podem não ser sensíveis o suficiente na detecção de fusões em NTRK3, como demonstrou um estudo com mais de 11 mil amostras de tumores sólidos, em que 45% dos casos com fusão em NTRK3 foram falso negativo por essa metodologia. O padrão de coloração imunohistoquímica utilizando o marcador Pan-TRK pode ser citoplasmático ou

nuclear, com intensidade podendo variar de fraca, moderada ou intensa, conforme exemplificado na figura 5 abaixo.

Figura 5 - Fotomicrografia dos padrões de coloração imunohistoquímica para Pan-TRK

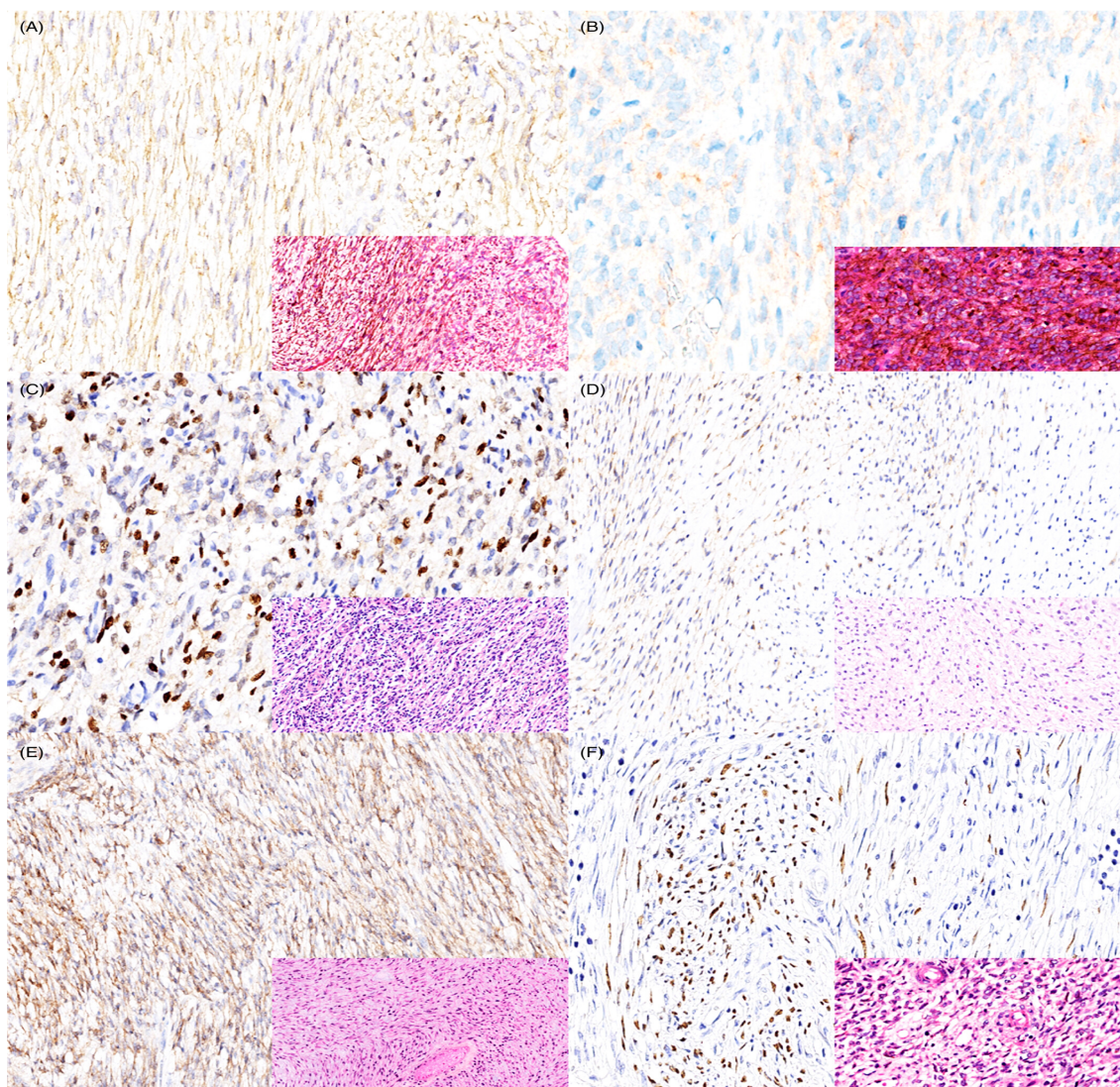


Fonte: Costigan DC et al. NTRK-Rearranged Uterine Sarcomas: Clinicopathologic Features of 15 cases, Literature Review, and Risk stratification. Am J Surg Pathol. 2022;46(10):1415–29 (17).

Legenda: O padrão de coloração imunohistoquímica utilizando o marcador Pan-TRK pode ser citoplasmático (A,B,C) ou nuclear(D), com intensidade podendo variar de fraca, moderada e intensa.

É importante ressaltar que, apesar do marcador pan-TRK ser positivo na maioria dos sarcomas uterinos com fusão NTRK, o padrão de coloração pode variar a depender da localização do gene parceiro. Por exemplo, o gene *LMNA* codifica uma proteína de membrana nuclear, que ao se tornar parceiro com NTRK1, levará a expressão positiva de pan-TRK na membrana nuclear. Diversos estudos alertam ainda para a positividade inespecífica ou ainda para a positividade cruzada no contexto dos sarcomas uterinos (Figura 6), entretanto, apesar das limitações, anticorpos pan-TRK representam um importante teste de triagem para casos que seguirão para confirmação molecular adicional (87,88).

Figura 6 - Fotomicrografia de imunomarcção falso-positiva com anticorpo Pan-TRK em casos de sarcoma do estroma endometrial.



Fonte: Al M et. Moura et al. Pan-TRK immunohistochemistry in gynaecological mesenchymal tumours: diagnostic implications and pitfalls. *Histopathology*. 2024 Feb;84(3):451-462. doi: 10.1111/his.15082. Epub 2023 Nov 21. *Histopathology* (23).

Legenda: Casos de Sarcoma do Estroma Endometrial evidenciando imunomarcção falso-positiva com anticorpo Pan-TRK. A.Rearranjo BCOR::ZC3H7B; B.Rearranjo YWHAE::NUTM2B. C.Rearranjo de YWHAE; D.Rearranjo de YWHAE; E.Rearranjo BCOR::ZC3H7B; F. Rearranjo JAZF1::SUZ12.

1.8.2 Sequenciamento de nova geração (NGS)

Painéis de sequenciamento NGS baseados em DNA, compostos por genes previamente estabelecidos, podem ser utilizados para detectar fusões. A molécula de DNA é mais estável que a molécula de RNA e os painéis de DNA

estão cada dia mais disponíveis nos laboratórios de diagnóstico. Porém, uma das desvantagens dessa técnica está no fato de que o espectro das fusões detectadas fica limitado aos genes incluídos no painel.

Outra desvantagem é que nos rearranjos de *NTRK*, e também de outros genes, muitos pontos de quebra (*breakpoints*) ocorrem em regiões intrônicas, altamente repetitivas, que são um desafio para serem estudadas por NGS de DNA (*short reads*). Na maioria dos painéis baseados em DNA essas regiões intrônicas não são avaliadas, o que impacta substancialmente na detecção das fusões.

Por outro lado, a detecção de uma fusão através do sequenciamento de RNA é uma evidência direta de que aquele é um produto transcrito de um evento genético funcional.

A ESMO, Sociedade Europeia de oncologia médica, publicou em 2019 suas recomendações relacionadas às diferentes técnicas moleculares para a detecção dos rearranjos em *NTRK*, destacando a alta sensibilidade e especificidade do NGS baseado em RNA (Figura 7). Tais recomendações podem hoje ser extendidas para todos os genes, visto que o sequenciamento de RNA é considerado, em diversos estudos, o método mais eficiente para detecção de fusões gênicas (89).

Figura 7 - Principais diferenças entre os métodos de detecção de fusão.

Method	Sensitivity	Specificity	Detection of all fusion genes	Detection of partner	Detection of expression	Screening
IHC	High ^a	High ^b	Yes	No	Yes	Yes
FISH ^c	High	High	One per probe	No	No	No
RNA seq NGS	High	High	Yes	Yes	Yes	Yes
DNA seq ^c	Moderate	High	Yes	Yes	No	Yes

^aFalse negatives reported mainly in *NTRK3* fusions.
^bIn the absence of smooth muscle/neuronal differentiation.
^cDetected rearrangements by DNA-based assays may not result in fusions, correlation with surgical pathology and predicted transcript (for sequencing) is needed.

Fonte: Marchiò C et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect *NTRK* fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol*. 2019;30(9):1417–27 (14).

Várias limitações do sequenciamento de genes de fusão baseado em DNA são superadas pelos métodos de sequenciamento baseados em RNA. Além de

identificar o transcrito (proteína quimérica) do gene de fusão resultante de uma translocação, a técnica ainda fornece dados sobre o parceiro de fusão, pontos de quebra e número de leituras que suportam a fusão. Com o sequenciamento de RNA é possível avaliar a funcionalidade do transcrito verificando se o quadro de leitura está mantido (fusão *in-frame*) ou se está alterado (fusão *out-of-frame*), assim como se o domínio funcional do gene está preservado (Figura 8) (89).

1.9 Justificativa do Estudo

A identificação de rearranjos gênicos nos sarcomas uterinos está em constante expansão, principalmente com o advento de terapias alvo-direcionadas, como os inibidores de *NTRK*, que permitiram uma abordagem terapêutica personalizada para os tumores raros. Sua eficácia, boa tolerância e via de administração, são fatores que levam a resultados favoráveis a longo prazo, em cenários localmente avançadas ou metastáticos(17,22). Ensaaios com inibidores de TRK, como entrectinibe e larotrectinibe, demonstraram benefício em tumores sólidos com fusões de *NTRK*, com respostas parciais em 50-62% dos pacientes e respostas completas em 7-13% dos casos (17). Em um estudo recente, com uma coorte de 259 casos de carcinoma de tireoide, foram detectadas fusões em *NTRK* em 6% dos casos, e foi possível concluir que, além de guiar tratamento personalizado, a pesquisa de fusões também pode ajudar a estabelecer diagnóstico, prognóstico e orientar conduta (90).

Há 2 relatos na literatura de pacientes com tumores uterinos com rearranjo de *NTRK* que foram tratadas com terapia alvo. A primeira paciente, com sarcoma em colo uterino de 9 centímetros, apresentou resposta completa com 27 semanas de tratamento neoadjuvante com entrectinib. Uma segunda paciente, com metástases pleurais comprovadas por biópsia, apresentava-se sem evidências de doença após tratamento com larotrectinibe. Há ainda, estudos relatando pacientes que evoluíram com recorrência tumoral, apesar de tratamento cirúrgico adequado, e há também relatos de óbito pela doença, sugerindo comportamento agressivo dos sarcomas uterinos com rearranjo de *NTRK* (91).

Os resultados promissores com terapia alvo para *NTRK* reforçam a necessidade da detecção de outros rearranjos, que no futuro possam também tornarem-se alvos de uma terapia específica.

Neste contexto, surge a urgência da correta identificação e caracterização dos sarcomas uterinos, através de uma análise integrada das características morfológicas, perfil de metilação e pesquisa de rearranjos gênicos. A identificação de novos biomarcadores gera informações que possibilitam o desenvolvimento de novas drogas para essa população oncológica.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar molecularmente os sarcomas uterinos, gerando dados embasados cientificamente que permitam que estratégias terapêuticas mais específicas possam ser aplicadas às pacientes diagnosticadas com esses tumores.

2.2 Específicos

Identificar as características clínico-epidemiológicas das pacientes com sarcomas uterinos diagnosticados e tratados no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2014 a 2024.

Classificar os sarcomas uterinos utilizando o perfil de metilação como ferramenta de suporte ao diagnóstico.

Identificar as fusões gênicas mais prevalentes nos tumores selecionados, através de painel de sequenciamento de nova geração (NGS) de RNA.

Descrever novos biomarcadores que permitam futuramente a indicação de terapias alvo-direcionadas dentro do cenário dos sarcomas uterinos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

De forma retrospectiva, buscou-se no sistema Pathox, casos diagnosticados como sarcoma uterino e que possuíam material arquivado no Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center, no período de 2014 a 2024. Amostras anteriores ao ano de 2014 foram excluídos da casuística visto que é recorrente a alta taxa de falha nos testes moleculares realizados em amostras antigas. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital, com registro número 3390/23.

Um total de 51 amostras (n=51) de sarcomas uterinos, fixadas em formol e preservadas em bloco de parafina, foram selecionadas após revisão histopatológica detalhada. Para avaliação molecular, cada amostra foi selecionada com base na porcentagem de células tumorais (>30%) e na adequação do tecido (<20% de necrose). Com o intuito de excluir interferentes histológicos como necrose, células inflamatórias e parênquima não neoplásico, e também para enriquecimento do conteúdo tumoral, a macrodissecção manual de seções de 5-10 µm de espessura foi realizada em todos os casos.

3.2 Metodologias

3.2.1 Painel NGS para fusões gênicas

Para realização do painel NGS, as amostras selecionadas foram submetidas à extração de RNA. Foram selecionados os casos que apresentavam pelo menos 30% de células tumorais viáveis. No bloco selecionado, foram feitos cortes na espessura de 5-10 micra, a depender o tamanho do tumor. Previamente à extração de RNA, todas as lâminas foram macrodissecadas para enriquecimento tumoral.

Na etapa de validação interna do painel, foram utilizadas amostras de sarcoma previamente sequenciados, com resultado conhecido. Após alguns testes, um protocolo misto, composto por 2 kits da Illumina, foi o que trouxe melhor rendimento para as amostras. Para a construção da biblioteca, foi utilizado o kit TSO500 RNA e para a etapa de captura, utilizou-se as sondas do TruSight® RNA Fusion Panel (Illumina, 507 genes), ensaio baseado em RNA-seq direcionado.

O protocolo consiste na conversão do RNA total extraído das amostras em uma biblioteca de moléculas de DNA complementar (cDNA) com origem de fita conhecida, seguida de um processo de enriquecimento seletivo de 507 genes previamente associados a fusões em neoplasias. As bibliotecas geradas são, então, adequadas para posterior geração de clusters e sequenciamento em plataforma de NGS, permitindo a identificação sensível de transcritos de fusão em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE).

Diferentemente do sequenciamento de transcriptoma total (WTS), que avalia globalmente todo o repertório de transcritos expressos, o TruSight RNA Fusion representa uma abordagem focada em genes de interesse, otimizando a detecção de fusões conhecidas e recorrentes, mas também permitindo a detecção de novos rearranjos.

A metodologia inclui fragmentação do RNA, síntese de cDNA, ligação de adaptadores, amplificação, captura por hibridização e enriquecimento das sequências-alvo. As etapas do protocolo serão descritas a seguir.

3.2.1.1 Etapas técnicas

3.2.1.1.1 Preparação da amostra e entrada de RNA

A metodologia foi otimizada para 10–100 ng de RNA total, sendo que a quantidade recomendada de RNA varia conforme a qualidade, que é avaliada pelo DV200: DV200 acima de 70%: utilizar 20 ng de RNA, DV200 entre 50–70%: utilizar 20–50 ng de RNA, DV200 entre 30–50%: utilizar 50–100 ng de RNA, as amostras com DV200 abaixo de 30% foram retiradas do estudo.

3.2.1.1.2 Preparação da biblioteca

Para a adenilação das extremidades 3', realizou-se a adição de *A-Tailing Mix* (ATL), seguida por incubação a 37°C por 30 minutos e 70°C por 5 minutos. Para a ligação de adaptadores, foram utilizados indexes únicos para cada amostra. Realizou-se a reação com *Ligation Mix* (LIG) a 30°C por 10 minutos. Ao término da incubação, foi acrescentado um tampão para parar a ligação de indexes e em seguida foi realizada nova purificação com AMPure XP Beads utilizando uma razão de 1X.

3.2.1.1.3 Amplificação inicial por PCR

Para a amplificação utilizou-se *PCR Primer Cocktail* (PPC) e *PCR Master Mix* (PMM). Para essa etapa foi realizada a ciclagem abaixo:

- 98°C por 30 segundos,
- 15 ciclos de 98°C por 10 segundos
- 60°C por 30 segundos
- 72°C por 30 segundos
- 72°C por 5 minutos.

Em seguida, seguiu-se para a purificação com AMPure XP Beads utilizando uma razão de 1X. Ao final dessa etapa, as bibliotecas foram quantificadas no Qubit (Thermo Fisher) e o perfil das bibliotecas foram avaliados através do Bioanalyzer (Agilent Technologies).

3.2.1.1.4 Hibridização, Captura e enriquecimento

As hibridizações foram feitas individualmente, utilizando 200ng de biblioteca. Para a hibridização das sondas utilizou-se *Capture Target Buffer 3* (CT3) e *RNA Fusion Oligos* (RFO) seguido de incubação térmica com os seguintes ciclos:

- 95°C por 10 minutos
- 18 ciclos decrescendo de 94°C a 58°C (2°C por ciclo).
- 58°C por 90 minutos.

Após as 2 horas de hibridização, foi feita a primeira captura, onde adicionamos as beads com Streptavidin Magnetic Beads (SMB) para que se liguem às moléculas hibridizadas, capturando as mesmas, seguido por lavagens com Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW). A segunda hibridização e captura foram realizadas da mesma maneira que a primeira. A hibridização dupla aumenta a especificidade das sondas. Em seguida, foi realizada uma purificação com AMPure XP Beads utilizando uma razão de 1.8X.

3.2.1.1.5 Amplificação final e verificação da biblioteca

Para a amplificação pós-enriquecimento, foi utilizado o *Enhanced PCR Mix (EPM)* e *PPC*, com ciclagem igual a primeira PCR, mas utilizando 14 ciclos de PCR. A purificação final da biblioteca foi feita com *AMPure XP Beads* utilizando uma razão de 1.8X. O produto final apresentou distribuição de tamanho entre 250–300 pares de base, avaliado com o Bioanalyzer 2100 (Agilent). A quantificação final das bibliotecas foi realizada usando o Qubit (Thermo Fisher).

3.2.2 Sequenciamento

As bibliotecas foram normalizadas e combinadas conforme o design de 12 amostras por corrida. Para o sequenciamento na plataforma NextSeq 2000 (Illumina), foi utilizado cartucho P1 Reagent Cartridge 300 ciclos, com concentração de carregamento de 700pM com ciclagem de 2X 76 e unique index, com 6 ciclos.

Após converter o RNA total em uma biblioteca de moléculas, foi feito o enriquecimento para 507 genes que já foram associados a fusões em câncer, através do Painel TruSight RNA Fusion, Illumina. Os 507 genes enriquecidos estão descritos a seguir:

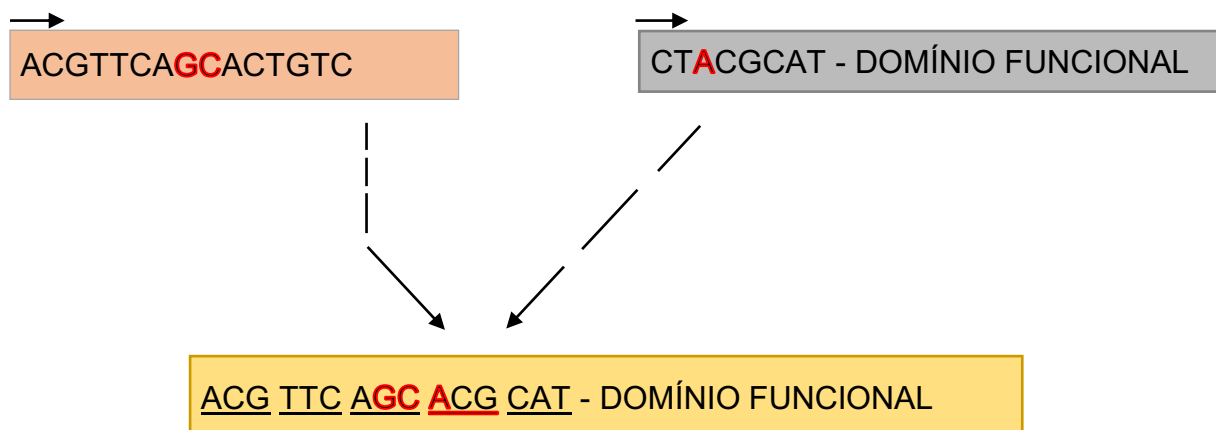
ABI1, ABL1, ABL2, ACACA, ACE, ACER1, ACKR3, ACSL6, ADD3, AFF1, AFF3, AFF4, AGR3, AHI1, AHRR, ALK, ANKRD28, AR, ARHGAP20, ARHGAP26, ARNT, ASPSCR1, ASTN2, ATF1, ATIC, ATP1B4, AUTS2, BACH2, BAG4, BAIAP2L1, BAZ2A, BCAS3, BCAS4, BCL10, BCL11A, BCL11B, BCL2, BCL2L1, BCL3, BCL6, BCL9, BCOR, BCR, BDNF, BICC1, BIRC3, BIRC6, BRAF, BRD1, BRD3, BRD4, BRWD3, BTBD18, BTG1, C11orf1, C11orf95, C2CD2L, C3orf27, CAMTA1, CAPRIN1, CARS, CASC5, CASP7, CBFA2T3, CBFB, CBL, CCAR2,

CCDC28A, CCDC6, CCDC88C, CCNB1IP1, CCNB3, CCND1, CCND2, CCND3, CD74, CDH11, CDK5RAP2, CDK6, CDX1, CDX2, CEBPA, CEBPB, CEBPD, CEBPE, CEP170B, CEP85L, CHD6, CHIC2, CHMP2B, CHST11, CIC, CIITA, CLP1, CLTC, CLTCL1, CMKLR1, CNBP, CNOT2, CNTRL, COG5, COL1A1, COL1A2, COL6A3, COX6C, CPSF6, CRADD, CREB1, CREB3L1, CREB3L2, CREBBP, CRLF2, CRTC1, CSF1, CSF1R, CTDSP2, CTNNB1, CUX1, DAB2IP, DACH1, DACH2, DDIT3, DDX10, DDX20, DEK, DMRT1, DNAJB1, DPM1, DUSP22, DUX4, EBF1, EEFSEC, EGFR, EGR1, EGR2, EGR3, EGR4, EIF4A2, ELF4, ELK4, ELL, ELN, EML1, EML4, EP300, EP400, EPC1, EPOR, EPS15, ERBB3, ERC1, ERCC1, ERG, ERLIN2, ESR1, ETS1, ETV1, ETV4, ETV5, ETV6, EWSR1, EZR, FAM19A2, FCGR2B, FCRL4, FEN1, FEV, FGF8, FGFR1, FGFR1OP, FGFR1OP2, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FHIT, FIP1L1, FLI1, FLNA, FLT3, FLT3LG, FNBP1, FOSB, FOSL1, FOXO1, FOXO4, FOXP1, FRK, FRYL, FUS, GAS5, GAS7, GATA1, GIT2, GLI1, GOSR1, GOT1, GPR128, GPR34, GRHPR, GRID1, GTF2I, H2AFX, HAS2, HEY1, HHEX, HIP1, HIPK1, HIST1H4I, HLF, HMGA2, HNF1A, HOXA10, HOXA11, HOXA13, HOXA9, HOXC11, HOXC13, HOXD11, HOXD13, HSP90AA1, ID4, IKZF1, IL2, IL21R, IL3, INPP5D, IQCG, IRF2BP2, IRF4, IRS4, ITK, JAK1, JAK2, JAZF1, KANK1, KAT6A, KAT6B, KDM5A, KIAA1524, KIF5B, KMT2A, KPNB1, KSR1, LASP1, LCK, LCP1, LGR5, LHFP, LHX2, LHX4, LINC00598, LINC00982, LMBRD1, LMO1, LMO2, LNP1, LPP, LPXN, LRMP, LRRC37B, LTBP1, LYL1, MACROD1, MAF, MAFB, MALT1, MAML2, MAPRE1, MBNL1, MBTD1, MDS2, MEAF6, MECOM, MGEA5, MKL1, MKL2, MLF1, MLLT1, MLLT10, MLLT11, MLLT3, MLLT4, MLLT6, MN1, MNX1, MSI2, MSN, MUC1, MUTYH, MYB, MYBL1, MYC, MYH11, MYH9, MYO18A, MYO1F, NAB2, NAPA, NBEAP1, NBR1, NCOA1, NCOA2, NCOA3, NDE1, NF1, NFATC2, NFIB, NGF, NGFR, NIN, NIPBL, NKX25, NONO, NOTCH1, NPM1, NR4A3, NR6A1, NSD1, NT5C2, NTF3, NTF4, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUMA1, NUP107, NUP214, NUP98, NUTM1, NUTM2A, NUTM2B, OFD1, OLIG2, OLR1, OMD, P2RY8, PAPP, PATZ1, PAX3, PAX5, PAX7, PAX8, PBX1, PCM1, PDE4DIP, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PER1, PHF1, PHF23, PICALM, PIM1, PLAG1, PML, POM121, POU2AF1, POU5F1, PPAP2B, PPARG, PPARGC1A, PPFIBP1, PPP2R1B, PRCC, PRDM16, PRKACA, PRKAR1A, PRKG2, PRRX2, PSIP1, PSMD2, PTPRR, PVT1, RABEP1, RAD51B, RAF1, RANBP2, RAP1GDS1, RARA, RBM15, RBM6, RCOR1, RCSD1, RET, RHOH, RNF213,

ROS1, RPL22, RPN1, RREB1, RRM1, RTEL1, RUNX1, RUNX1T1, SARNP, SEC31A, SEPT2, SEPT5, SEPT6, SEPT9, SERPINE1, SERPINF1, SET, SETBP1, SFPQ, SH3D19, SH3GL1, SIK3, SLC34A2, SLC45A3, SLCO1B3, SMAP1, SMARCA5, SMARCB1, SNHG5, SORBS2, SORT1, SP3, SPECC1, SPTBN1, SQSTM1, SRF, SRSF3, SS18, SS18L1, SSBP2, SSX1, SSX2, SSX4, ST6GAL1, STAT5B, STAT6, STRN, SUGP2, SUZ12, SYK, TACC1, TACC2, TACC3, TAF15, TAL1, TAL2, TAOK1, TBX15, TCF12, TCF3, TCL1A, TCTA, TEAD1, TEAD2, TEAD3, TEAD4, TEC, TENM1, TET1, TFE3, TFG, TFPT, TFRC, TGFB3, THADA, THRAP3, TIRAP, TLX1, TLX3, TMPRSS2, TNFRSF17, TOP1, TOP2B, TP53BP1, TPM3, TPM4, TRHDE, TRIM24, TRIP11, TRPS1, USP16, USP42, USP6, VGLL3, WASF2, WDR18, WDR70, WHSC1, WHSC1L1, WSB1, WT1, WWTR1, XIAP, YAP1, YTHDF2, YWHAE, ZBTB16, ZC3H7A, ZC3H7B, ZFP64, ZFPM2, ZFYVE19, ZMIZ1, ZMYM2, ZMYND11, ZNF207, ZNF384, ZNF444, ZNF521, ZNF585B, ZNF687.

Para a análise secundária dos dados utilizou-se a plataforma Illumina Connected Analytics (ICA), que utiliza DRAGEN para a chamada de variantes. Para a análise terciária utilizou-se o Illumina Connected Insights (ICI), que correlaciona as variantes detectadas com diversos banco de dados, auxiliando na classificação de patogenicidade da variante. Os parâmetros de qualidade da corrida, como porcentagem de leituras alinhadas nas regiões alvo (% de reads on target), cobertura média nas regiões alvo, e porcentagem de regiões alvo com cobertura maior que 20X foram avaliados na plataforma ICA. A avaliação parâmetros de qualidade da amostra, assim como avaliação do status “in-frame” e avaliação da manutenção dos domínios funcionais foram avaliados na plataforma ICI. Foram considerados verdadeiros os transcritos quiméricos que mantiveram o quadro de leitura transcricional, preservando a organização das bases em trincas, e com o domínio funcional intacto (figura 8).

Figura 8 - Avaliação funcional da fusão gênica



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Modelo hipotético de um gene de fusão formado a partir do rearranjo entre os genes A e B. A estrutura do gene de fusão deve manter o alinhamento transcricional, o que pode ser avaliado por meio da análise do ponto de quebra genômico (detalhe). A organização em trincas deve ser mantida após o rearranjo, preservando o quadro de leitura (in-frame) e o domínio funcional deve ser preservado intacto, sem quebras em sua sequência.

Na plataforma ICI foi avaliado o número de reads pareadas (paired reads) e o número de reads divididas (split reads) como evidências de suporte para a identificação de eventos de fusão. As split reads referem-se às leituras que se alinham aos dois genes parceiros, atravessando diretamente o ponto de quebra. As paired reads correspondem a leituras que se alinham aos dois genes parceiros, flanqueando o ponto de quebra, em uma orientação compatível com a ocorrência da fusão. Do ponto de vista metodológico, as split reads apresentam maior especificidade, uma vez que demonstram de forma inequívoca a junção gênica. Por outro lado, os paired reads podem sofrer influência de regiões repetitivas ou de erros de mapeamento, razão pela qual são aplicados limiares mais restritivos para sua interpretação. A soma do número de split reads e paired reads fornece o número total de reads que suportam a existência da fusão.

Como já descrito, a qualidade do RNA é um fator crítico para o sucesso da análise, sobretudo em amostras fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE). Valores reduzidos de integridade (RIN) ou de DV200 comprometem a cobertura efetiva dos pontos de junção, impactando diretamente na sensibilidade

e na confiabilidade da detecção de fusões. Neste estudo foram selecionadas para o sequenciamento as amostras com DV200 acima de 30%. Os parâmetros de qualidade empregados na análise do resultado do sequenciamento estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros de qualidade utilizados na análise de NGS

Parâmetro	Valor de referência	Observação
Split reads	≥ 2	Considerados mais específicos, pois atravessam o ponto de quebra.
Paired reads	≥ 2	Limiar mais restritivo devido a possíveis erros de mapeamento.
Comprimento médio dos insertos	> 80 pb	Garante qualidade adequada do alinhamento.
% Reads on Target	>90	Percentual de leituras mapeadas nas regiões dos genes do painel
Cobertura de 20X em regiões alvo	% >60	Percentual de regiões alvo com cobertura de 20X
Cobertura média das regiões de interesse e cobertura da fusão	$\geq 60X$	Cobertura mínima para detecção robusta de fusões.
Filtros de qualidade VCF	PASS	Apenas variantes que passaram nos filtros de qualidade foram consideradas.

Fonte: Adaptado de Illumina - Manual do usuário.

3.2.3 Perfil de Metilação Global do DNA

Para realização do perfil de metilação, as amostras selecionadas foram submetidas à extração de DNA. Foram selecionados os casos que

apresentavam pelo menos 30% de células tumorais viáveis. No bloco selecionado, foram feitos cortes na espessura de 5-10 micra, a depender o tamanho do tumor. Todas as amostras passaram por enriquecimento tumoral por macrodissecção manual previamente à extração de DNA.

3.2.3.1 Etapas técnicas

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Foram utilizados de 100 a 250 ng de DNA para posterior conversão por bissulfito. O DNA genômico foi convertido por bissulfito utilizando o kit EZ DNA Methylation Kit, Zymo Research D5001, de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante e utilizando a ciclagem alternativa sugerida para ensaios de array de metilação (95oC por 30 segundos, 50oC por 60 minutos) por 16 ciclos.

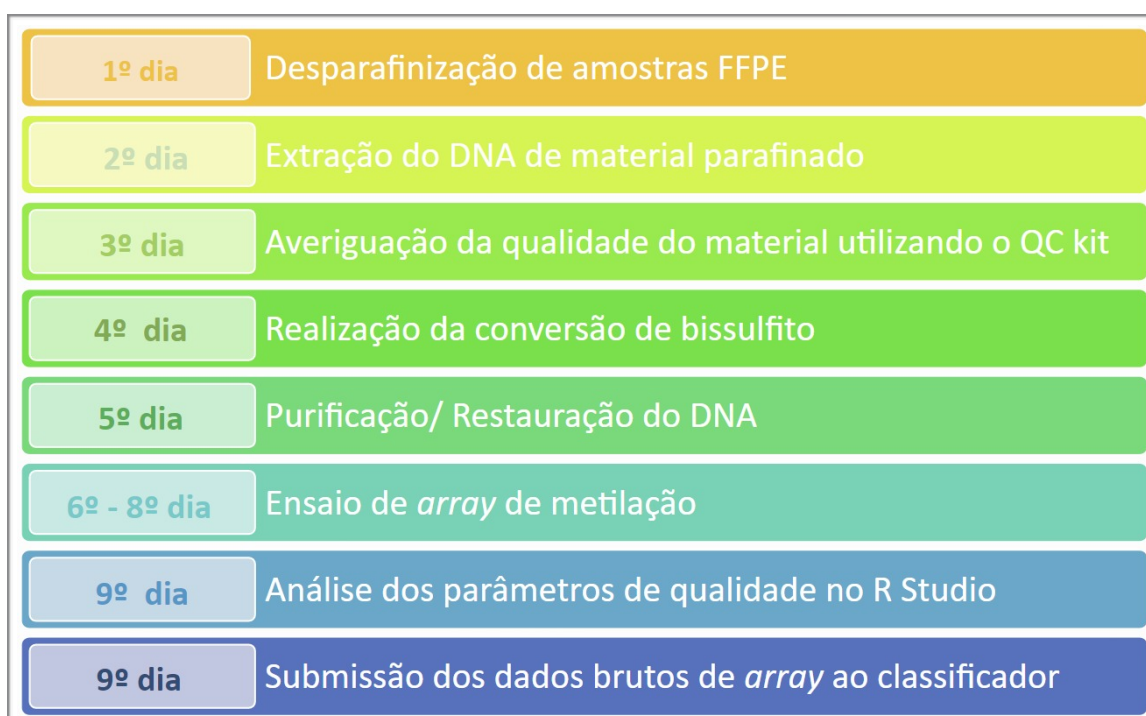
Após a etapa de conversão, as amostras foram submetidas a uma etapa de restauração pré array, indicada pela fabricante Illumina. No processo foram utilizados os kits Infinium HD FFPE Restore (Illumina®) e ZR-96 Genomic DNA Clean & Concentrator (Zymo Research®). Juntos, esses kit são capazes de realizar uma PCR isotérmica restaurando as regiões genômicas contempladas no BeadChip de array e de maior interesse clínico. O DNA foi processado utilizando o Illumina Infinium HumanMethylation EPIC BeadChip array (Illumina®) de acordo com as instruções do fabricante. O BeadChip foi escaneado pelo iScan gerando dados brutos no formato .idat.

Após a conversão por bissulfito, é realizada a amplificação de genoma completo (WGA - whole-genome amplified), seguida por fragmentação enzimática. As amostras WGA-DNA tratadas por bissulfito são então aplicadas na Beadchips. Nesta etapa, as moléculas de WGA-DNA se ligam em uma sequência específica de DNA, permitindo a identificação de diversos locus CpG: um para região com status metilado (C) e outro para a região com status não-metilado (T). Em

seguida, primers alelo-específicos permitem a extensão de uma única base usando ddNTPs (dideoxynucleotides triphosphates) marcados com DNP (dinitrofenil) ou Biotina. O mesmo locus CpG irá incorporar o mesmo tipo de nucleotídeo marcado, determinado pela presença de um “C” ou “T”, e, portanto, a detecção em pelo menos um canal de fluorescência. Após a etapa de extensão, marcação de fluorescência e escaneamento das Beadchips, as intensidades das beads não-metiladas e metiladas são medidas, gerando dois arquivos de dados IDAT, um para fluorescência verde e outro para a fluorescência vermelha. O protocolo completo é realizado em uma semana (Figura 9).

Os arquivos IDAT gerados foram analisados através do classificador de

Figura 9 - Etapas técnicas do array de metilação



Fonte: Autoria própria.

Legenda: etapas do fluxo de trabalho para realização do array de metilação de amostras parafinadas.

sarcomas da Universidade de Heidelberg, versão 13.1, disponível online através do site *molecularneuropathology.org*. Utilizando o classificador, um report foi gerado para cada amostra. Através de algoritmos de aprendizado de máquina e

bioinformática, dados de variação de número de cópias e um escore calibrado para a classe de metilação mais provável foi gerado para cada amostra.

A interpretação dos escores calibrados de metilação foi realizada de acordo com as recomendações do Classificador de sarcomas de Heidelberg (versão v13.1)(92) e em consonância com os critérios previamente descritos por Wu et al. (2021). Nesta versão, apenas predições com escore calibrado $\geq 0,90$ são consideradas classificadas com alto grau de confiança diagnóstica. Predições com valores de escore inferiores a 0,90 podem, entretanto, apresentar relevância em situações específicas, como em amostras com baixo conteúdo tumoral ou qualidade de DNA prejudicada, devendo, portanto, ser interpretadas com cautela e sempre em associação com os parâmetros anatomopatológicos e moleculares disponíveis.

No que se refere à classificação hierárquica, a versão v13.1 do classificador estabelece que apenas predições em nível de superfamília com escore calibrado $\geq 0,30$ são apresentadas, enquanto os níveis hierárquicos subsequentes (classes e subclasses) são reportados quando alcançam escores calibrados $\geq 0,10$, favorecendo uma interpretação mais detalhada e acurada da probabilidade diagnóstica em múltiplos níveis de resolução (tabela 3).

Dessa forma, os valores de corte para utilização do escore calibrado de metilação foram interpretados da seguinte maneira, a saber:

- Escore maior ou igual a 0,90: alta confiança para o diagnóstico;
- Escore maior ou igual a 0,3, porém abaixo de 0,90: sugere o diagnóstico, porém necessita de integração com os parâmetros anatomopatológicos e moleculares disponíveis;
- Escore inferior a 0,3: não contribui para o diagnóstico.

Tabela 3 - Análise do escore calibrado para a classe de metilação

Faixa de escore calibrado	Interpretação	Observações
---------------------------	---------------	-------------

Tabela 3 - Análise do escore calibrado para a classe de metilação

$\geq 0,90$	Alta confiança diagnóstica	Classificação considerada definitiva; pode ser utilizada como diagnóstico principal.
$\geq 0,30$ e $< 0,90$	Sugestivo de diagnóstico	Necessita correlação com parâmetros anatomopatológicos e moleculares; pode ter relevância em amostras com baixo conteúdo tumoral ou DNA de menor qualidade.
$< 0,30$	Não contribui para diagnóstico	Escore abaixo do limiar mínimo estabelecido; não é reportado como diagnóstico.

Fonte: Jager N et al. Advancing sarcoma diagnostics with expanded DNA methylation-based classification (92)

Legenda: Interpretação dos valores de escore calibrado de metilação (classificador V13.1)

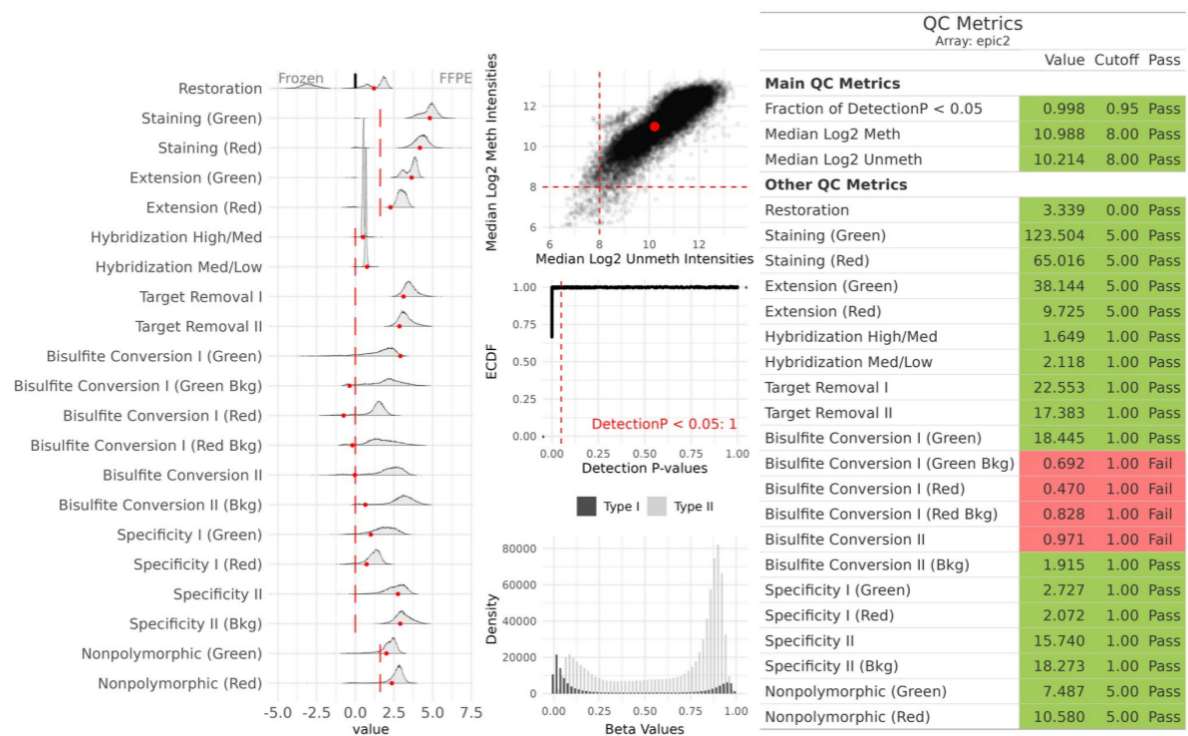
3.2.3.2 Métricas de qualidade para o perfil de metilação

As métricas de qualidade foram avaliadas com base nos parâmetros derivados das sondas de controle presentes nos *arrays* de metilação da Illumina. Ao todo, são geradas 21 métricas de qualidade, que permitem monitorar diferentes etapas do processo experimental, como restauração, coloração, extensão, hibridização, remoção de alvo e eficiência da conversão por bissulfito.

Na representação gráfica, exemplificada pela figura 10, os pontos vermelhos correspondem aos valores obtidos para a amostra analisada, enquanto as distribuições adjacentes demonstram a variabilidade observada em bancos de dados de referência. As linhas verticais vermelhas indicam os valores de corte recomendados para cada parâmetro.

Figura 10: Representação gráfica das métricas de controle de qualidade do perfil de metilação.

Quality Control Metrics



Fonte: Illumina Methylation Arrays, epic2. Versão 13.1.

Legenda: Forma como as métricas principais e secundárias são apresentadas para controle de qualidade das amostras.

A avaliação global da qualidade do ensaio é baseada principalmente em três métricas principais:

1. Proporção de sondas CpG com *p-value* de detecção < 0,05;
2. Intensidade mediana (log2) do sinal metilado;
3. Intensidade mediana (log2) do sinal não metilado.

Uma amostra é considerada adequada para classificação de metilação quando atende a esses três critérios mínimos. Pequenas variações em métricas secundárias geralmente não comprometem a acurácia da classificação, mas podem indicar possíveis falhas ocorridas durante as etapas laboratoriais. Nesse sentido, falhas simultâneas em múltiplas métricas secundárias devem ser investigadas com atenção, pois podem comprometer a robustez da análise.

Tabela 3 – Métricas de qualidade avaliadas no array de metilação (Illumina).

Categoria	Métrica de qualidade	Critério de aceitação	Interpretação
Métricas principais	Proporção de sondas CpG com <i>p-value</i> < 0,05	≥ 0,95	Amostras abaixo desse valor apresentam falhas de detecção.
	Intensidade mediana (log2) do sinal metilado	≥ 8,0	Valores baixos sugerem baixa qualidade do DNA ou falhas de hibridização.
	Intensidade mediana (log2) do sinal não metilado	≥ 8,0	Valores baixos podem indicar problemas de conversão ou perda de material.
Métricas secundárias	Restauração	> 0,0	Avalia a eficiência de restauração do DNA em FFPE.
	Coloração (<i>Green</i> e <i>Red</i>)	≥ 5,0	Verifica qualidade da marcação fluorescente.
	Extensão (<i>Green</i> e <i>Red</i>)	≥ 5,0	Mede eficiência de incorporação de nucleotídeos.
	Hibridização (<i>High/Med</i> e <i>Med/Low</i>)	≥ 1,0	Avalia eficiência de hibridização do DNA às sondas.
	Remoção de alvo I e II	≥ 1,0	Controla possíveis falhas na etapa de remoção de sondas não específicas.
	Conversão por bissulfito I e II (<i>Green/Red</i>)	≥ 1,0	Verifica eficiência da conversão de citosinas não metiladas em uracilas.

	Especificidade I e II (<i>Green/Red</i>)	$\geq 1,0$	Avalia hibridização cruzada e especificidade das sondas.
	Sondas não polimórficas (<i>Green/Red</i>)	$\geq 5,0$	Garante ausência de viés em sondas de controle não polimórficas.

Fonte: Adaptado das instruções do fabricante (Illumina Methylation Arrays, epic2).

5. DESENVOLVIMENTO

Um total de 51 casos foram selecionados para o estudo. Foi criado um banco de dados na plataforma REDCap, com número de registro 3390-23 - *Avaliação das Fusões Gênicas em Pacientes com Sarcomas Uterinos e Sua Aplicação na Prática Clínica*, para gerenciamento e compartilhamento dos dados da pesquisa.

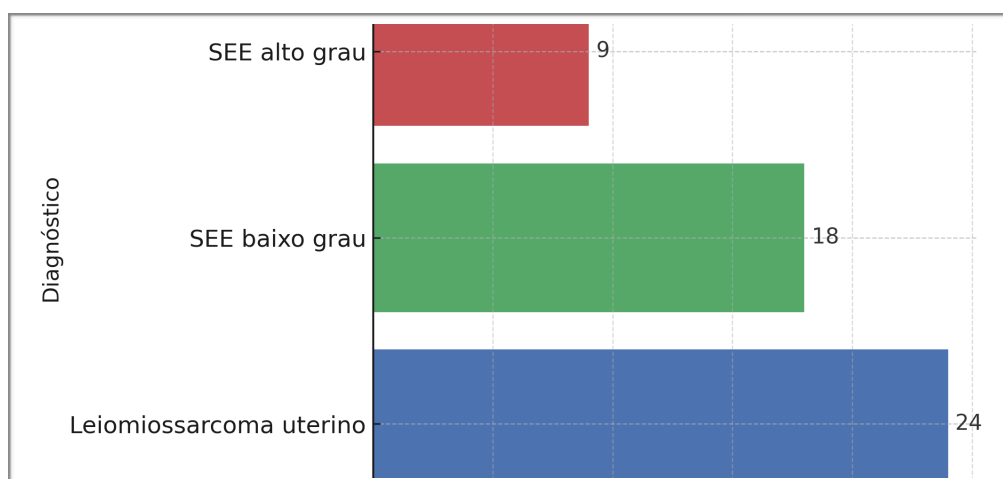
6. RESULTADOS

6.1 Dados sócio-demográficos, anatomopatológicos e clínicos

A idade média das pacientes ao diagnóstico foi de 49 anos, sendo 26 anos a menor idade ao diagnóstico e 82 anos, a maior.

Quanto ao diagnóstico histopatológico, foram selecionados 24 casos de Leiomiossarcoma uterino (47,1%), 18 casos de Sarcoma do estroma endometrial de baixo grau (SEE baixo grau) (35,3%) e 9 casos de Sarcoma do estroma endometrial de alto grau (SEE alto grau) (17,6%), representados na figura 11, abaixo:

Figura 11 – Distribuição dos casos por diagnóstico anatomopatológico

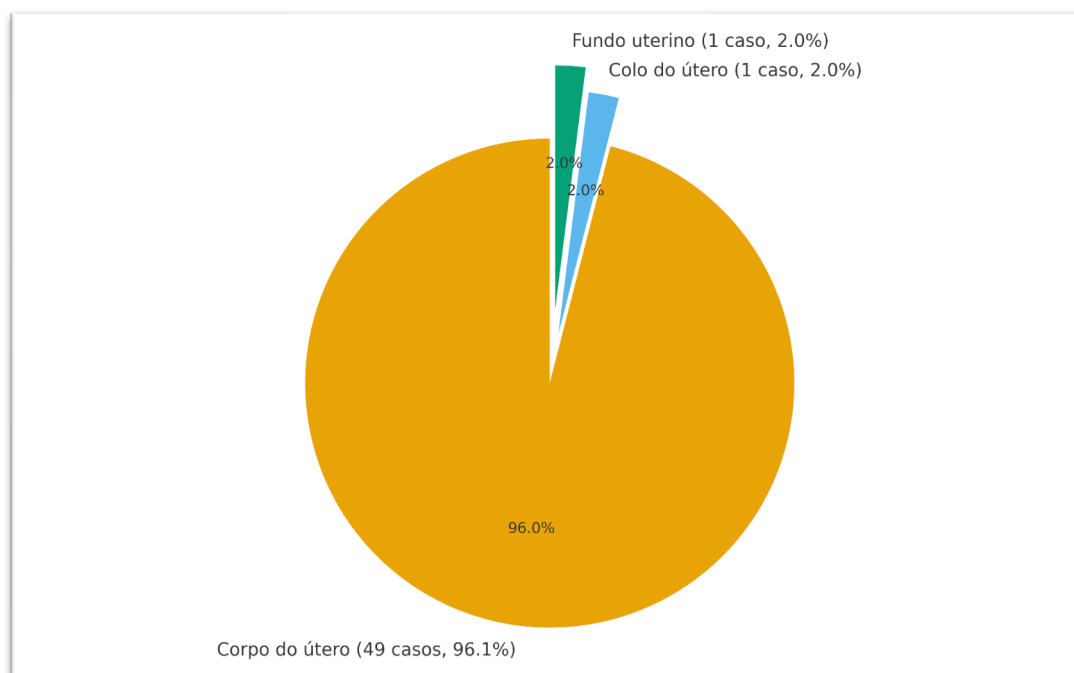


Fonte: Autoria própria.

Legenda: Um total de 51 casos foram selecionados para o estudo: 24 casos de leiomiossarcoma uterino, 18 casos de sarcoma do estroma endometrial de baixo grau (SEE baixo grau) e 9 casos de sarcoma do estroma endometrial de alto grau (SEE alto grau).

Quanto à localização, 96,1% dos casos acometiam o corpo do útero (49 casos), 2,0% acometiam o colo do útero (1 caso), e 2,0% acometiam o fundo uterino (1 caso).

Figura 12 – Localização do tumor primário.

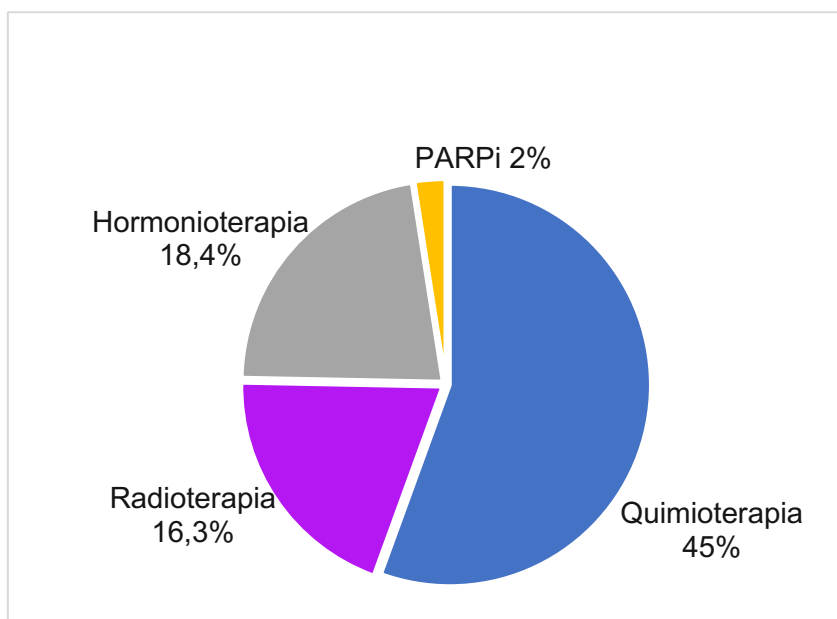


Fonte: Autoria própria.

Em relação ao status menopausal, a maioria das pacientes, 42,9% dos casos, não havia atingido a menopausa, 32,7% já estavam na menopausa; em 24,5% dos casos não foi possível obter essa informação.

Todas as pacientes do estudo foram hysterectomizadas. Em 85,7% dos casos, apenas o tratamento cirúrgico foi realizado. Nas demais pacientes, além da cirurgia, outros tratamentos foram associados, como a quimioterapia, em 44,9% dos casos, radioterapia, em 16,3% dos casos, hormonioterapia em 18,4%, e inibidor de PARP em 2,0% dos casos.

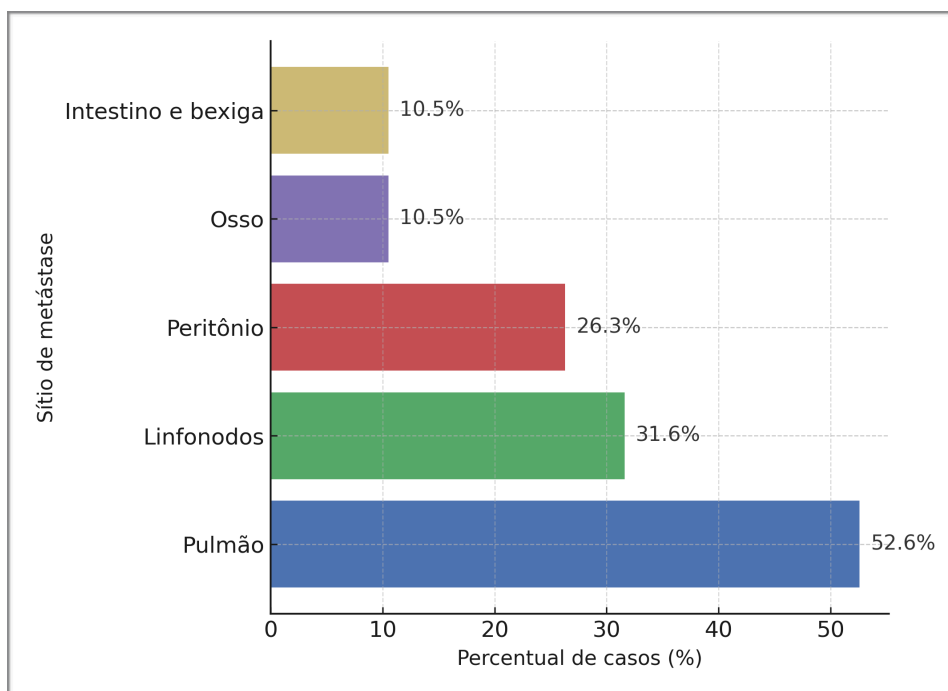
Figura 13 – Tipo de tratamento associado à cirurgia.



Fonte: Autoria própria.

Neste estudo, a taxa de recidiva foi de 41,7% (20 casos). A recidiva à distância foi a mais prevalente (85% dos casos), sendo o pulmão o sítio mais acometido por metástases (52,6%), seguido pelos sítios: linfonodos (31,6%), peritônio (26,3%), osso (15,8%), intestino e bexiga (10,5%). O tratamento de escolha para os casos de recidiva foi a quimioterapia, na maioria dos casos (63,2%).

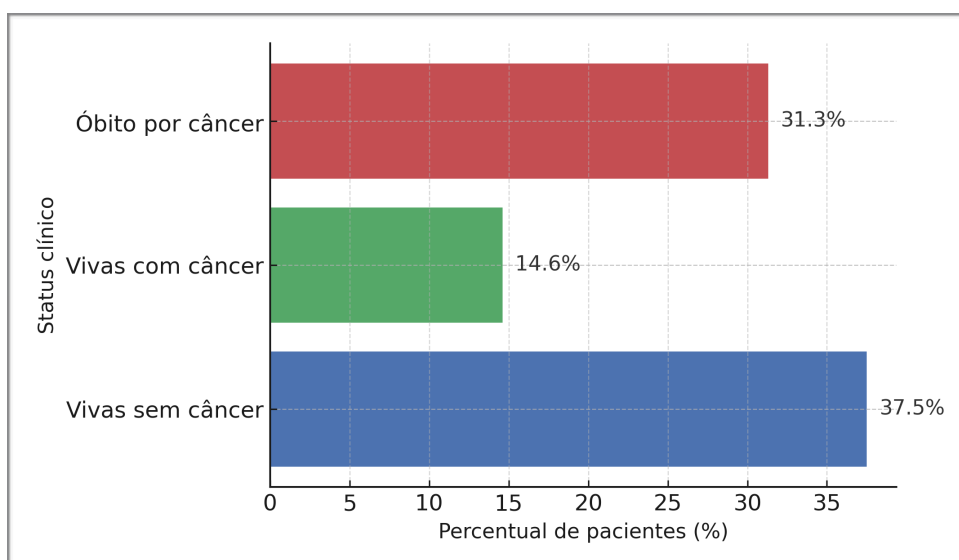
Figura 14: Sítio anatómico da recidiva tumoral



Fonte: Autoria própria.

Em relação à data da última avaliação, 18 pacientes estavam vivas sem câncer (37,5%) e 7 pacientes estavam vivas com câncer (14,6%); 15 pacientes haviam morrido por câncer (31,3%). A sobrevida geral média foi de 50,19 meses.

Figura 15 – Status clínico das pacientes na última avaliação



Fonte: Autoria própria.

Foi levantado ainda os anticorpos utilizados no estudo imunohistoquímico dos casos avaliados. Vale ressaltar que os painéis de anticorpos não são uniformes para todos os casos, e que alguns marcadores, como a Ciclina D1 e Caldesmon por exemplo, raramente estavam presentes nos painéis. Ainda assim, foi possível observar taxa de positividade acima de 60% para os principais marcadores de músculo liso nos casos de Leiomiossarcoma uterino; Alta positividade de receptores hormonais e CD10 nos casos de SEE de baixo grau e nos casos de SEE de alto grau, observou-se CD10 e Ciclina D1 como as maiores taxas de positividade (tabela 4).

Tabela 4: Positividade imunohistoquímica dos casos estudados

	Desmina	Caldesmon	Actina de músculo liso	Receptores hormonais (RE/RP)	CD10	Ciclina D1
Leiomiossarcoma uterino	17 casos (71%)	9 casos (37,5%)	15 casos (62,5%)	10 casos (42%)	6 casos (25%)	1 caso (4%)
SEE de baixo grau	2 casos (14%)	Zero	3 casos (21%)	13 casos (93%)	12 casos (86%)	2 casos (14%)
SEE de alto grau	1 caso (11%)	2 casos (22%)	1 caso (11%)	3 casos (33%)	6 casos (66,7%)	7 casos (77,8%)

Fonte: Autoria própria.

Legenda: Taxa de positividade para os principais anticorpos utilizados no estudo imunohistoquímico dos sarcomas uterinos.

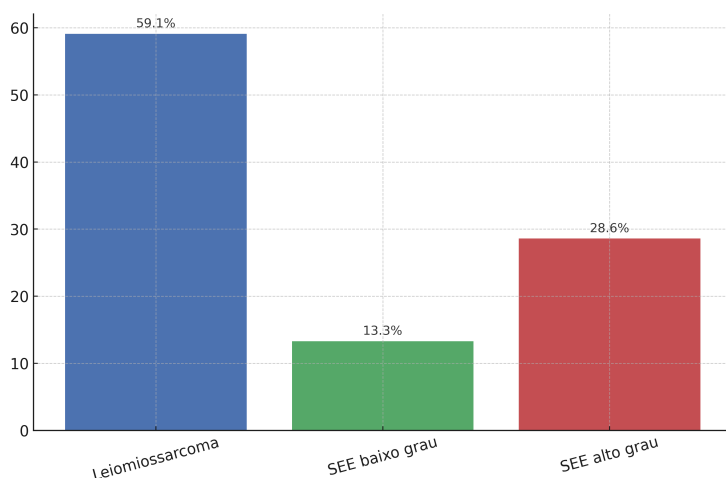
6.2 Análise estatística

Para a verificação da independência entre as variáveis categóricas utilizou-se o teste de qui-quadrado de Pearson; dado o tamanho amostral por célula, a avaliação foi complementada pelo teste exato de Fisher quando houve frequências esperadas inferiores a 5, condição que torna o Fisher mais apropriado e conservador. Foram avaliadas especificamente as variáveis recidiva, sobrevida livre de doença e sobrevida global.

6.2.1 Análise de recidiva por diagnóstico anatomopatológico

Foi realizada análise de associação entre o tipo de diagnóstico (Leiomiossarcoma, SEE de baixo grau e de alto grau) e a ocorrência de recidiva (sim/não). Observou-se recidiva tumoral em 13 casos (59,1%) de Leiomiossarcoma; em dois casos (13,3%) de SEE de baixo grau e em dois casos (28,6%) de SEE de alto grau.

Figura 16 - Frequência de recidiva por tipo tumoral.



Fonte: Autoria própria.

O resultado indicou diferença estatisticamente significativa nas proporções de recidiva entre os três grupos diagnósticos com p-valor menor que 0,05. O teste de qui-quadrado de Pearson ($p=0,016$) e a razão de verossimilhança ($p=0,012$) indicam associação estatisticamente significativa entre o diagnóstico e a taxa de recidiva. O teste exato de Fisher-Freeman-Halton ($p=0,014$) confirma a robustez dessa associação, o que é importante, dado o tamanho amostral reduzido, com menos de 5 casos em algumas categorias.

Além disso, a análise de associação linear por linear ($p=0,031$) sugere que pode haver um gradiente de risco, no qual o Leiomiossarcoma apresenta pior prognóstico, seguido pelo SEE de alto grau, enquanto o SEE de baixo grau se associa a menor risco de recidiva.

Figura 17 – Recidiva tumoral (sim/não) com teste exato de Fisher.

Crosstab						
			Diagnóstico			Total
			1 Leiomiossarcoma	2 SEE baixo grau	3 SEE alto grau	
Recidiva	0 No	Contagem	9	13	5	27
		% em Diagnóstico	40,9%	86,7%	71,4%	61,4%
	1 Yes	Contagem	13	2	2	17
		% em Diagnóstico	59,1%	13,3%	28,6%	38,6%
Total		Contagem	22	15	7	44
		% em Diagnóstico	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Testes qui-quadrado						
	Valor	df	Significância Assintótica (Bilateral)	Sig exata (2 lados)	Sig exata (1 lado)	Probabilidade de ponto
Qui-quadrado de Pearson	8.232 ^a	2	0,016	0,014		
Razão de verossimilhança	8,781	2	0,012	0,018		
Teste exato de Fisher-Freeman-Halton	8,120			0,014		
Associação Linear por Linear	4.674 ^b	1	0,031	0,036	0,023	0,016
N de Casos Válidos	44					
a. 2 células (33,3%) esperavam uma contagem menor que 5. A contagem mínima esperada é 2,70.						
b. A estatística padronizada é -2,162.						

Fonte: Autoria própria.

Estágio Clínico

A avaliação do estágio clínico inicial foi realizada em 48 casos. A maioria dos pacientes foi diagnosticada em estádios iniciais, com 13 casos (27,1%) classificados como estágio IA e 17 casos (35,4%) como estágio IB, totalizando 62,5% dos casos nos estádios I. Os estádios IIB e III foram observados em 2 (4,2%) e 3 (6,3%) casos, respectivamente. Já os estádios avançados IVA e IVB corresponderam a 2 (4,2%) e 11 (22,9%) casos, respectivamente. Considerando a classificação agrupada, 35 casos (72,9%) apresentavam doença restrita aos estádios I–III, enquanto 13 casos (27,1%) foram diagnosticados em estádios IV.

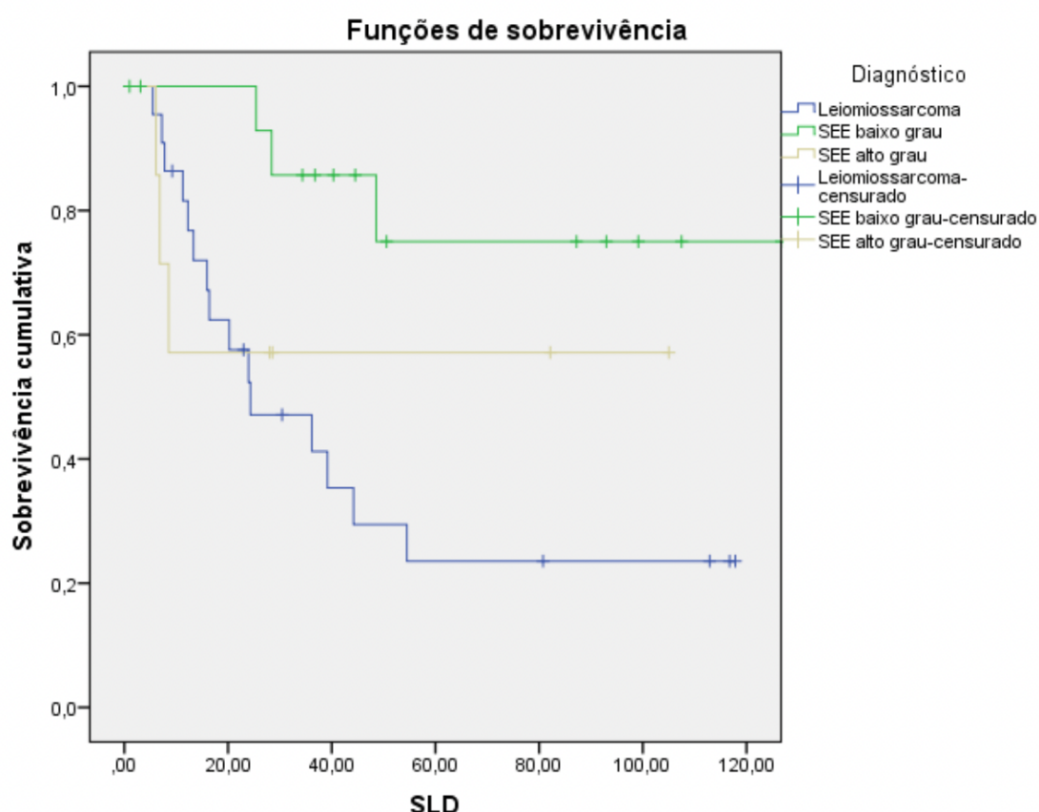
6.2.2 Tempo de sobrevida livre de doença por diagnóstico anatomopatológico

Na análise da sobrevida livre de doença, a comparação entre os subtipos histológicos por meio do teste de Log-rank (Mantel–Cox) evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os casos de leiomiossarcoma e sarcoma do

estroma endometrial de baixo grau, com valor de qui-quadrado de 9,12 e $p = 0,003$.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na sobrevida livre de doença entre leiomiossarcoma e sarcoma do estroma endometrial de alto grau (qui-quadrado = 0,36; $p = 0,547$), nem entre os grupos de sarcoma do estroma endometrial de baixo grau e alto grau (qui-quadrado = 2,01; $p = 0,156$).

Figura 18 - Tempo de sobrevida livre de doença.



Fonte: Autoria própria.

A análise da mediana de sobrevida, estratificada por estágio clínico e diagnóstico histológico, também evidenciou diferenças entre os grupos avaliados.

Nos casos diagnosticados em estádios clínicos I–II, a mediana de sobrevida para leiomiossarcoma foi de 36,2 meses (erro padrão: 16,6), com intervalo de confiança de 95% entre 3,6 e 68,7 meses. Para os casos de sarcoma do estroma endometrial de baixo grau, a mediana de sobrevida foi estimada em 345,3 meses, não sendo possível calcular o intervalo de confiança devido ao elevado número de casos censurados. A mediana de sobrevida não foi estimável para os casos de sarcoma do estroma endometrial de alto grau nesse grupo.

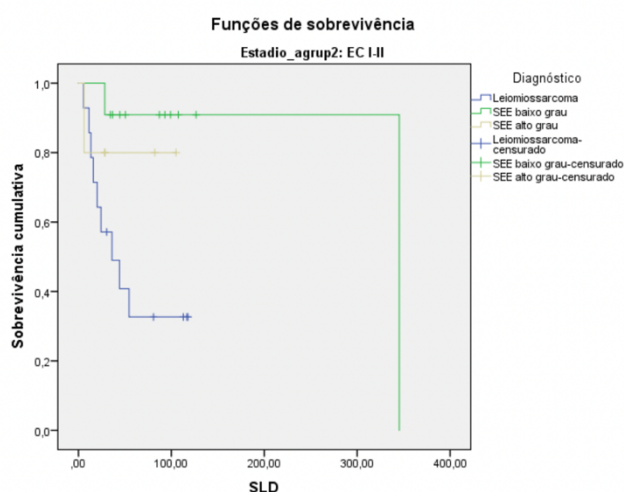
Considerando todos os diagnósticos em conjunto, a mediana de sobrevida nos estádios I–II foi de 345,3 meses.

Nos estádios clínicos III–IV, a mediana de sobrevida para leiomiossarcoma foi de 16,4 meses (erro padrão: 5,2), com intervalo de confiança de 95% entre 6,2 e 26,6 meses. Para os casos de sarcoma do estroma endometrial de baixo grau, a mediana de sobrevida foi de 48,6 meses, enquanto para o sarcoma do estroma endometrial de alto grau foi de 6,8 meses. A mediana de sobrevida global nesse grupo foi de 24,0 meses, com intervalo de confiança de 95% entre 6,2 e 41,7 meses.

Na análise comparativa por meio do teste de Log-rank (Mantel–Cox), observou-se diferença estatisticamente significativa na sobrevida entre leiomiossarcoma e sarcoma do estroma endometrial de baixo grau nos estádios I–II ($p = 0,007$). Ainda nesse grupo, não houve diferença estatisticamente significativa entre leiomiossarcoma e sarcoma do estroma endometrial de alto grau ($p = 0,238$), nem entre os subtipos de sarcoma do estroma endometrial ($p = 0,445$).

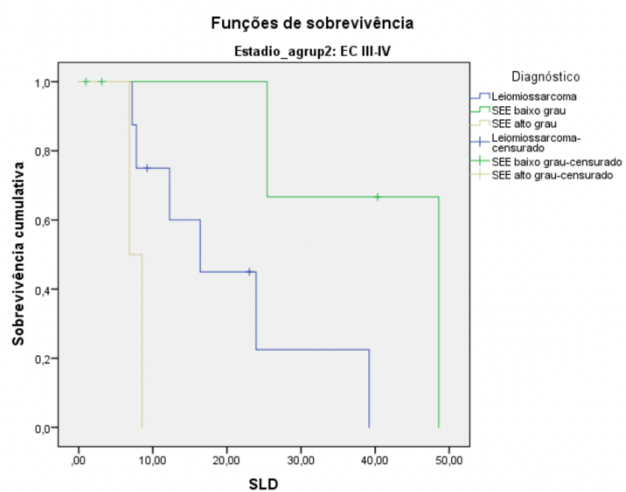
Nos estádios III–IV, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre leiomiossarcoma e sarcoma do estroma endometrial de baixo grau ($p = 0,054$). Em contraste, houve diferença estatisticamente significativa entre leiomiossarcoma e sarcoma do estroma endometrial de alto grau ($p = 0,042$), bem como entre os subtipos de sarcoma do estroma endometrial de baixo e alto grau ($p = 0,039$).

Figura 19 - Tempo de sobrevida livre de doença – EC I-II.



Fonte: Autoria própria.

Figura 20 - Tempo de sobrevida livre de doença – EC III-IV.



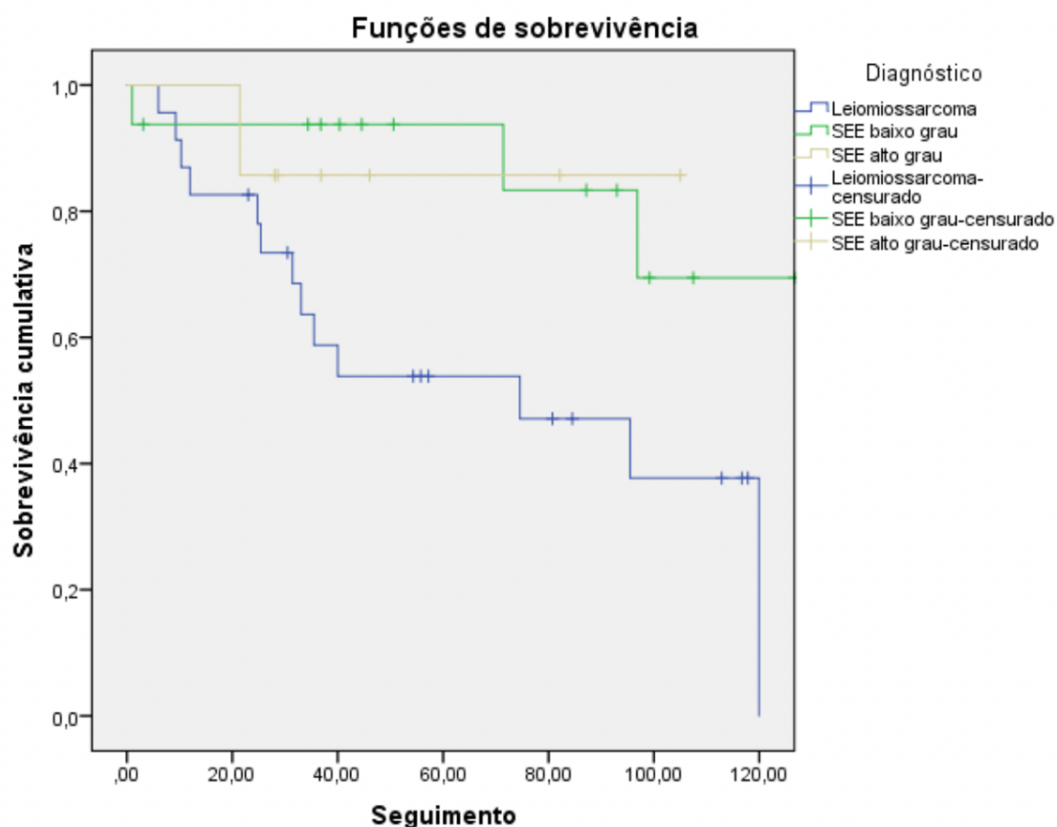
Fonte: Autoria própria.

6.2.3 Sobrevida global por diagnóstico anatomopatológico

A mediana de sobrevida nos casos de leiomiossarcoma foi de 74,6 meses, com intervalo de confiança de 95% variando de 11,1 a 138,0 meses. Na análise comparativa por meio do teste de Log-rank (Mantel–Cox), observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos leiomiossarcoma e sarcoma do estroma endometrial de baixo grau ($p = 0,015$).

Considerando a coorte total, a mediana de sobrevida foi de 119,9 meses, com intervalo de confiança de 95% entre 85,0 e 154,9 meses.

Figura 21 - Tempo de sobrevida global



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Mediana de sobrevida global com diferença estatisticamente significativa entre os grupos leiomiossarcoma e sarcoma do estroma endometrial de baixo grau ($p = 0,015$).

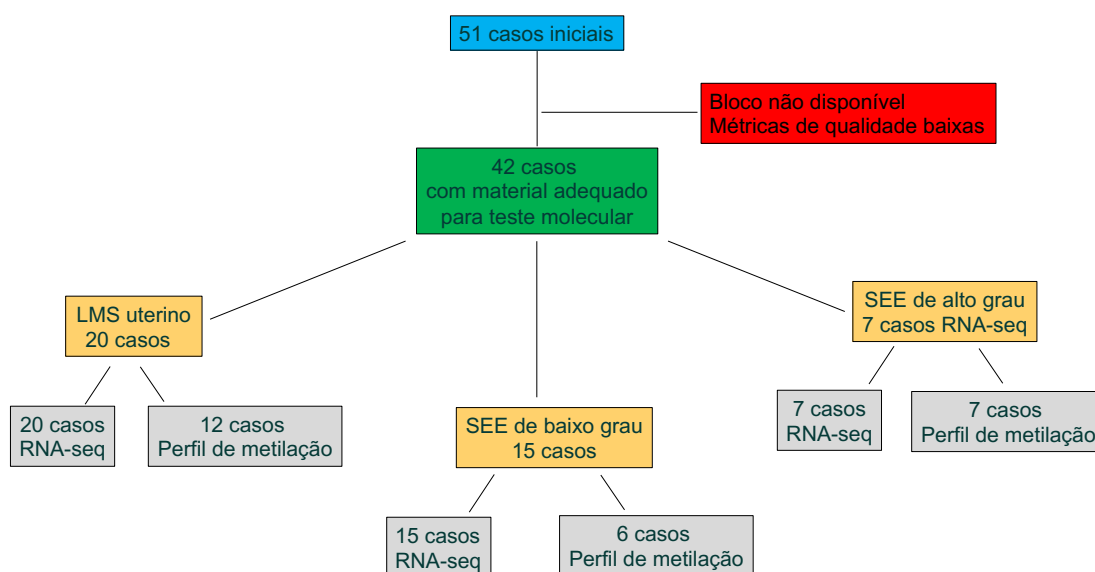
Além disso, a análise da sobrevida global demonstrou associação com o estágio clínico ao diagnóstico. Nos casos em estágios clínicos III–IV, a mediana de sobrevida global foi de 95,5 meses, com intervalo de confiança de 95% variando de 0,0 a 197,2 meses. A comparação entre os grupos por meio do teste de Log-rank (Mantel–Cox) evidenciou diferença estatisticamente significativa na sobrevida global entre os estágios I–II e III–IV ($p = 0,005$).

6.3 Achados Moleculares e epigenéticos por grupo diagnóstico

Devido aos parâmetros mínimos de qualidade necessários para a análise molecular, nem todos os casos foram elegíveis para a testagem. Dessa forma, um total de 42 amostras foram enviadas para sequenciamento (NGS) de RNA. Amostras cujo RNA não apresentou qualidade adequada, não foram

sequenciadas. Da mesma forma, os casos que apresentaram falha de biblioteca e também não alcançaram os parâmetros ideais para o sequenciamento, mesmo após repetição das reações, foram retirados da casuística de sequenciamento (por isso a diminuição do n amostral). Seguiram para o sequenciamento 20 amostras de Leiomiossarcoma, 15 amostras de SEE de baixo grau e 7 amostras de SEE de alto grau. Das 42 amostras sequenciadas, 16 delas tiveram fusão gênica detectada (38%). Os resultados do NGS serão apresentados a seguir, de acordo com o grupo tumoral.

Figura 22: Fluxograma do número de casos elegíveis para teste molecular.



Fonte: Autoria própria.

Legenda: Um total de 42 casos foram elegíveis para testagem molecular.

6.3.1 Leiomiossarcoma - Estudo molecular e epigenético

Dentre as 20 amostras de Leiomiossarcomas, 17 amostras (85%) não tiveram fusão gênica detectada. Três casos (15%) apresentaram uma fusão gênica

considerada verdadeira, são elas: *COL1A2::COL1A1*; *RUNX1::ABCA10* e *CLTC::TANC2*. Esses três rearranjos estão descritos na tabela abaixo (tabela 5).

Tabela 5 - Fusões detectadas em Leiomiossarcomas uterinos.

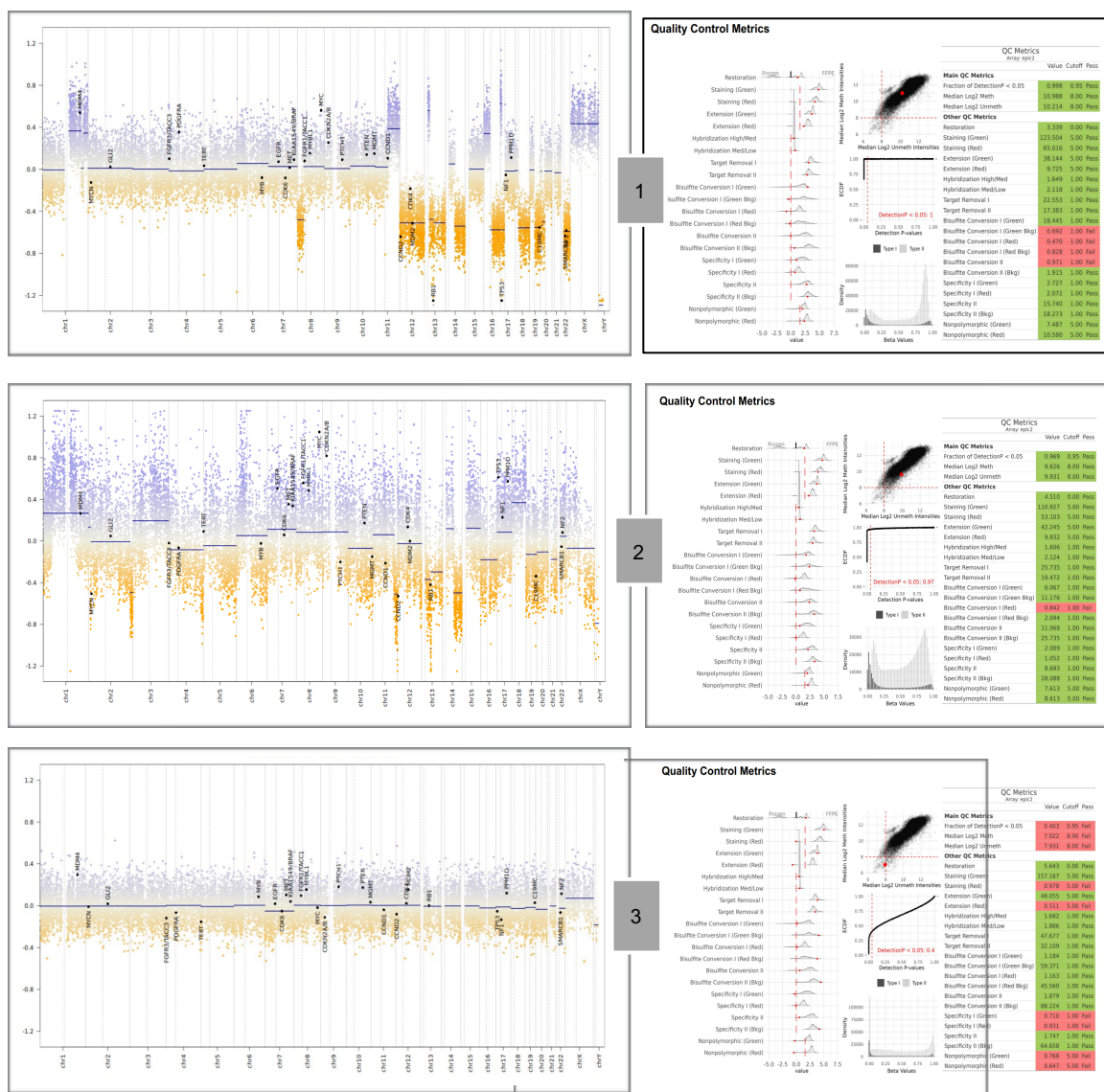
Rearranjo gênico	Coordenada cromossômica	Ponto de quebra (éxon/éxon)	Split reads (n)	Paired reads (n)	Supporting reads (n total)	Cobertura	Tamanho do inserto (pb)
<i>COL1A2::COL1A1</i>	t(7;17)(q21.3;q21.33)	37/28	2	1	3	2090	86
<i>RUNX1::ABCA10</i>	t(17;21)(q24.3;q22.12)	2/4	14	3	17	1773	131
<i>CLTC::TANC2</i>	t(17;17)(q23.1;q23.3)	2/6	50	3	53	795	98

Fonte: Autoria própria.

Para a análise de perfil de metilação, 12 casos de Leiomiossarcoma uterino foram selecionados. Em cinco casos (42%) não foi possível obter um resultado conclusivo pois as métricas de qualidade não foram atingidas. Dos sete casos que atingiram as métricas de qualidade, seis (86%) foram classificados dentro da classe de metilação “Leiomioma/Leiomiossarcoma uterino” pelo Classificador de Sarcomas de Heidelberg, versão 13.1. Todos os casos apresentaram ganhos e perdas cromossômicas, além de perda em homozigose de RB1, TP53 e PTEN.

Um caso previamente diagnosticado como Leiomiossarcoma uterino foi classificado dentro da classe de metilação “Sarcoma pleomórfico indiferenciado/Mixofibrossarcoma/lipossarcoma pleomórfico/rabdomiossarcoma pleomórfico”, com score calibrado de 0,65, e score de 0.32 para a subclasse do Mixofibrossarcoma. Na análise de alteração de número de cópias (CNV), a amostra não apresenta deleção em homozigose de RB1 e TP53. O mesmo caso apresentou a fusão *CLTC::TANC2*, já descrita na tabela acima.

Figura 23 - Gráficos de CNV e métricas de controle de qualidade – Leiomiossarcoma.



Fonte: Autoria própria.

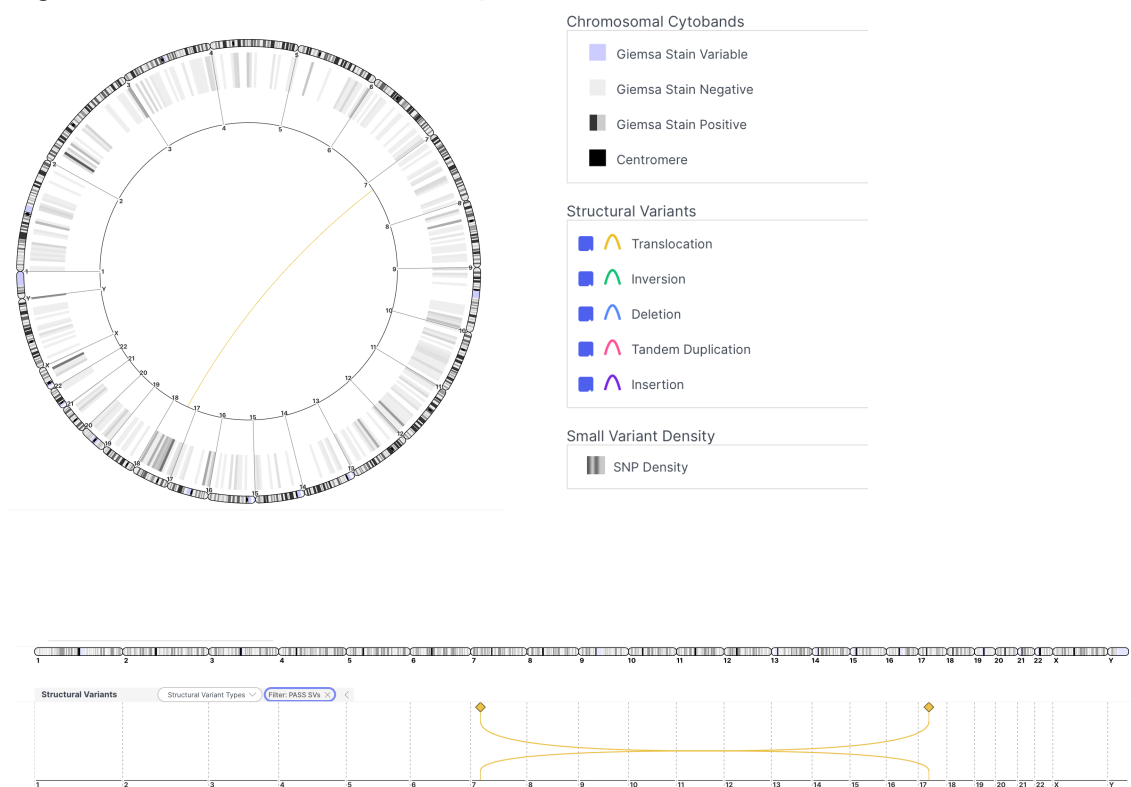
Legenda: 1. Leiomiossarcoma uterino com as três métricas de qualidade principais adequadas para análise de perfil de metilação, e com falha em 4 métricas secundárias. Gráfico de CNV com deleção homozigótica de TP53 e RB1; Perdas cromossômicas em 8p, 12, 13q, 14q, 16q, 17p, 18q, 19q e 22q. Amplificação de MYC e gene MDM2 não amplificado. 2. Sarcoma indiferenciado com as três métricas principais adequadas para análise de perfil de metilação, e com falha em uma métrica secundária. Gráfico de CNV demonstrando genoma complexo, com alteração de número de cópias afetando diversos cromossomos. 3. Leiomiossarcoma uterino com falha nas três métricas principais e em 6 métricas secundárias, considerado inadequado para análise. Gráfico de CNV considerado inválido.

6.3.2 SEE de baixo grau - Estudo molecular e epigenético

Quinze amostras (n=15) de SEE de baixo grau foram submetidas ao sequenciamento de RNA. Uma amostra (6,7%) apresentou resultado inconclusivo por parâmetros de qualidade inadequados. Cinco (33,3%) casos não apresentaram rearranjo e 9 (60%) casos apresentaram uma fusão gênica considerada verdadeira.

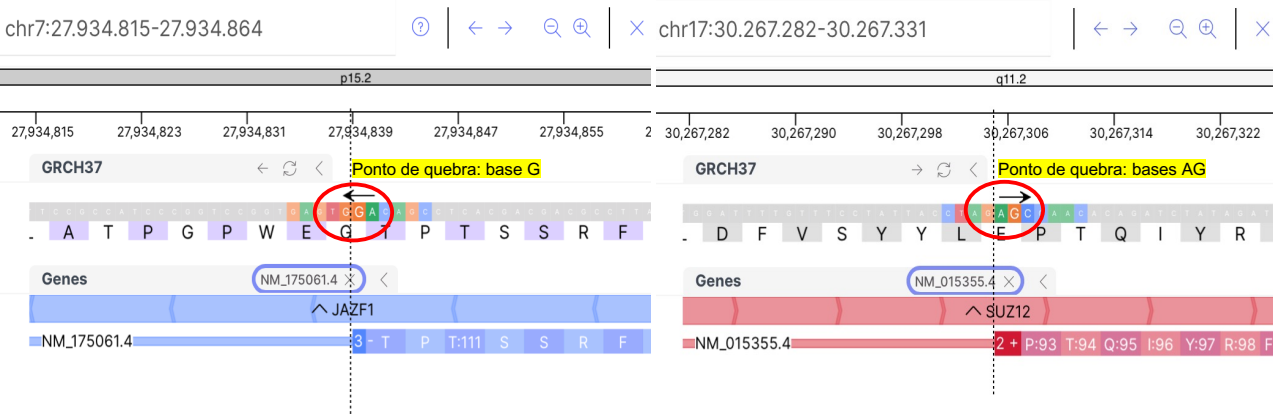
A fusão *JAZF1::SUZ12* foi a mais frequentemente detectada, presente em 7 (77,8%) dos nove casos positivos. A coordenada dos rearranjos é t(7;17)(p15.2;q11.2), com os pontos de quebra já classicamente descritos na literatura, ocorrendo no éxon 3 do gene *JAZF1* e no éxon 2 do gene *SUZ12* (figura 21 e 22).

Figura 24 – Gráficos de visualização do rearranjo *JAZF1::SUZ12*



Fonte: Autoria própria.
Legenda: Circus plot e linear plot demonstrando a translocação entre o cromossomo 7 e o 17.

Figura 25 – Visualização dos pontos de quebra da fusão *JAZF1::SUZ12*



Fonte: Autoria própria.
Legenda: Análise dos pontos de quebra para verificar a manutenção do quadro de leitura. Nesse caso, o ponto de quebra no gene *JAZF1* deixa a base “G” livre, e no gene *SUZ12* observa-se 2 bases livres no ponto de quebra, as bases “A” e “G”. Dessa forma é possível verificar que a fusão está *in-frame*, ou seja, o rearranjo está mantendo a sequência de bases organizadas em trincas. Não há domínio funcional nas regiões de quebra.

Além da fusão *JAZF1::SUZ12*, foram detectadas outras duas fusões, *PHF1::SPAG1* e *RNF8::CUX1*, ainda não descritas nesse tipo tumoral. Os dados das fusões novas estão descritos na tabela abaixo (tabela 6).

Tabela 6 - Fusões detectadas em SEE de baixo grau.

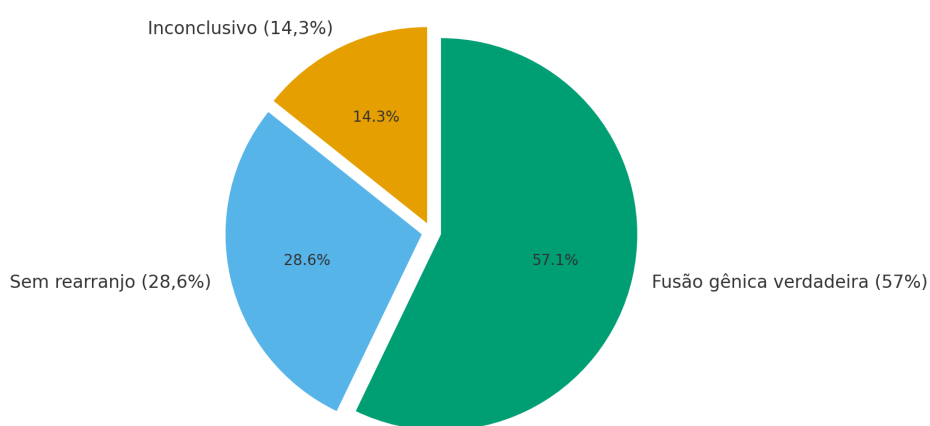
Rearranjo gênico	Coordenada cromossômica	Ponto de quebra (éxon/éxon)	Split reads (n)	Paired reads (n)	Supporting reads (n total)	Cobertura	Tamanho do inserto (pb)
<i>PHF1::SPAG1</i>	t(6;8)(p21.32;q22.2)	1/5	3	0	3	30	99
<i>RNF8::CUX1</i>	t(6;7)(p21.2;q22.1)	2/3	2	0	2	158	95

Fonte: Autoria própria.

Seis casos (n=6) de SEE de baixo grau foram selecionados para análise de perfil de metilação. Houve falha nas métricas de qualidade em 2 casos (33%) e não foi possível obter um resultado conclusivo para esses casos. Quatro casos

detectados rearranjos e quatro casos (57%) apresentaram uma fusão gênica considerada verdadeira (Figura 24).

Figura 27 – Distribuição das amostras de SEE de alto grau.



Fonte: Autoria própria.

Dois casos apresentaram a fusão *YWHAE::NUTM2B*. Os outros dois casos apresentaram fusões envolvendo o gene *BCOR*: *ZC3H7B::BCOR* e *CIITA::BCOR*. Os dados das fusões detectadas estão descritos na tabela abaixo (tabela 7).

Tabela 7 - Fusões detectadas em SEE de alto grau.

Rearranjo gênico	Coordenada cromossômica	Ponto de quebra (éxon/éxon)	Split reads (n)	Paired reads (n)	Supporting reads (n total)	Cobertura	Tamanho do inserto (pb)
<i>YWHAE::NUTM2B</i>	t(10;17)(q22.3;p13.3)	5/2	12	1	13	150	89

Tabela 7 - Fusões detectadas em SEE de alto grau.

Rearranjo gênico	Coordenada cromossômica	Ponto de quebra (éxon/éxon)	Split reads (n)	Paired reads (n)	Supporting reads (n total)	Cobertura	Tamanho do inserto (pb)
<i>YWHAE::NUTM2B</i>	t(10;17)(q22.3;p13.3)	5/2	31	0	31	1698	105
<i>ZC3H7B::BCOR</i>	t(X;22)(p11.4;q13.2)	10/7	27	0	27	706	104
<i>CIITA::BCOR</i>	t(X;16)(p11.4;p13.13)	5/7	32	1	33	81	98

Fonte: Autoria própria.

Sete casos (n=7) de SEE de alto grau foram selecionados para análise de perfil de metilação. Houve falha nas métricas de qualidade em 4 casos (57%) e não foi possível obter um resultado conclusivo para esses casos. Três casos (43%) apresentaram métricas de qualidade adequadas. Dois casos foram classificados dentro da classe de metilação “Sarcoma do estroma endometrial de alto grau”, com score calibrado acima 0,99 (match), pela versão 13.1 do Classificador de Sarcomas de Heidelberg. Os casos não apresentaram alteração de número de cópias ao longo dos cromossomos, pela análise de CNVs realizada pelo classificador.

7. Discussão

O leiomiossarcoma uterino é um sarcoma agressivo, responsável por 40–50% dos sarcomas uterinos, e 1–2% das malignidades uterinas. Apesar de geralmente se apresentar em estágios avançados e ter taxa global de sobrevida em 5 anos de apenas 15–25%, fatores como menor tamanho tumoral (<5 cm) e restrição ao útero se associam a melhor prognóstico (93,94). Neste estudo, a sobrevida global das pacientes com LMS uterino foi de 70,8 meses.

As alterações moleculares mais comuns no LMS uterino envolvem os genes *TP53*, *ATRX* e *MED12* (95,96), alterações que também foram detectadas neste estudo, mas nessa casuística observou-se principalmente as deleções em homozigose de *RB1*, *TP53* e *PTEN*.

Três fusões novas foram detectadas nos casos de LMS uterino nesse estudo: *COL1A2::COL1A1*; *RUNX1::ABCA10* e *CLTC::TANC2*. Os genes *COL1A1* e *COL1A2*, que codificam as cadeias alfa do colágeno tipo I, estão frequentemente implicados em neoplasias mesenquimais e em doenças do tecido conjuntivo. Alterações estruturais em *COL1A1*, incluindo translocações com *PDGFB*, são detectadas em mais de 90% dos casos de dermatofibrossarcoma protuberans, muitas vezes associadas à formação de cromossomos em anel supranumerários (97–99). Além disso, estudos transcriptômicos indicam que *COL1A1* e *COL1A2*, frequentemente em conjunto com *NF1*, estão enriquecidos em vias relacionadas à matriz extracelular e à ligação a proteases, sugerindo potencial papel oncogênico e participação no desenvolvimento de osteossarcoma e sarcoma de Ewing (100). Por fim, evidências recentes demonstram que *COL1A2* pode atuar como alvo de *TBX3*, influenciando a migração celular em fibrossarcomas e condrossarcomas (101), enquanto variantes estruturais em *COL1A1* e *COL1A2* também foram associadas à patogênese da osteogênese imperfeita (102).

Foi detectada também a fusão *RUNX1::ABCA10* em um caso de LMS uterino. Não foram identificados estudos específicos que associem *RUNX1* e *ABCA10* ao leiomiossarcoma uterino. Entretanto, *RUNX1* tem papel descrito em tumores do sistema hematológico e em alguns cânceres epiteliais femininos, como carcinoma endometrióide, carcinoma de ovário e de mama (103).

A fusão *CLTC::TANC2* foi detectada em um caso previamente diagnosticado como leiomiossarcoma uterino, com perfil de metilação de mixofibrossarcoma. Fusão envolvendo o gene *CLTC* já foi descrita previamente em um caso de mixofibrossarcoma na coxa, porém juntamente com o parceiro *GNAC* (*GNA13::CLTC*), demonstrando seu papel oncogênico em sarcomas (104). Até o momento não há descrições de rearranjos entre *CLTC* e *TANC2* em tumores uterinos.

Para a confirmação desses três rearranjos, está sendo realizada a análise de expressão dos transcritos através de arquivos de bioinformática em formato BIGWIG e posteriormente será realizada a confirmação por método ortogonal.

O sarcoma do estroma endometrial (SEE) de baixo grau é um tumor uterino indolente, geralmente associado a fusões gênicas envolvendo *JAZF1::SUZ12* e genes relacionados (105–108) . Apresenta curso clínico prolongado, mesmo em casos recorrentes, e seu prognóstico depende fortemente do estágio ao diagnóstico: tumores confinados ao útero têm taxa de sobrevida em 5 anos superior a 90%, enquanto doença avançada reduz este índice para cerca de 50% (109)

Neste estudo, a análise de sobrevida global demonstrou sobrevida de 119,2 meses para SEE de baixo grau (IC95%: 94,2–144,2) e apenas 13,3% de taxa de recidiva. A fusão *JAZF1::SUZ12* foi a mais frequente nessa casuística, entretanto não foi possível estabelecer papel prognóstico dessa fusão em relação às outras também detectadas nesse grupo após análise estatística específica.

Duas fusões novas em SEE de baixo grau foram detectadas nesse estudo. Há descrição na literatura do papel dos genes *PHF1*, *SPAG1*, *RNF8* e *CUX1* em diferentes tipos tumorais. *PHF1* é um dos genes mais descritos em SEE de baixo grau, depois de *JAZF1* e *SUZ12*, entretanto, seu rearranjo com *SPGA1* ainda não foi descrito nesse cenário.

O gene *RNF8* (110) codifica uma proteína da família *RING finger*, atuando como E3 ubiquitina ligase envolvida na mono-ubiquitinação das histonas H2A e H2B, propagação do sinal de dano ao DNA e manutenção da estabilidade genômica. Está localizado no cromossomo 6p21.3 e possui domínios funcionais relacionados tanto à interação proteína-proteína (FHA) quanto à atividade ligase (RING). *RNF8* participa da resposta ao dano ao DNA mediada por ATM/ATR e

DNA-PK, sendo essencial para o recrutamento de complexos *BRCA1* e 53BP1 no reparo de quebras de dupla fita (111). Além disso, foi descrito como regulador de *ATM* em células de sarcoma de Ewing (112) e como potencial alvo terapêutico, dado que a inibição de *RNF8* pode aumentar a quimiossensibilidade a drogas como doxorrubicina. Apesar de sua função clássica protetora, há evidências de que o gene pode também favorecer crescimento tumoral e metástases em determinados contextos.

O gene *CUX1* atua como fator de transcrição, sendo considerado um supressor tumoral haploinsuficiente que pode estar superexpresso em neoplasias avançadas (113). Alterações envolvendo *CUX1* foram descritas em neoplasias hematopoiéticas, incluindo sarcomas histiocíticos e de células dendríticas (114). Em sarcomas, já foi relatada a fusão *CUX1::BRAF*, considerada funcionalmente relevante (115)

Embora a fusão *RNF8::CUX1* ainda não esteja caracterizada em detalhe na literatura, a combinação de um gene central na resposta ao dano ao DNA (*RNF8*) com um gene envolvido na regulação transcricional e progressão tumoral (*CUX1*) sugere um potencial impacto no comportamento biológico das células tumorais, reforçando a necessidade de estudos funcionais adicionais para elucidar seu papel nos sarcomas.

Para a confirmação desses dois rearranjos ainda não descritos, está sendo realizada a análise de expressão dos transcritos através de arquivos de bioinformática em formato BIGWIG e posteriormente será realizada a confirmação por método ortogonal de RT-PCR.

Adicionalmente, foi realizada análise específica para verificar se existia correlação estatisticamente significativa entre uma fusão específica em SEE de baixo grau e as taxas de recidiva e sobrevida. Neste estudo não foi encontrado correlação entre uma fusão específica e as taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global nos casos de SEE de baixo grau.

O SEE de alto grau é uma neoplasia rara e agressiva, frequentemente associada a fusões gênicas já previamente caracterizadas na literatura *YWHAE::NUTM2A/B*, *ZC3H7B::BCOR* ou *BCOR* ITD (116–118). Apresenta

comportamento mais agressivo e pior prognóstico em comparação ao SEE de baixo grau, com maior propensão à recidiva precoce e evolução desfavorável.

Foi detectado nessa casuística um caso de SEE de alto grau com uma fusão não descrita, envolvendo os genes *CIITA::BCOR*. O gene *CIITA*, principal transativador do MHC classe II, atua na resposta imune tumoral e pode ser silenciado por mecanismos epigenéticos em sarcomas pediátricos, como o rabdomiossarcoma, resultando em perda da indução de MHC classe II por IFN- γ (119). Além disso, o gene *CIITA* participa de fusões gênicas imunomoduladoras descritas em linfomas de Hodgkin, nas quais a modulação de MHC/PD-L1 integra vias de escape imune (120). Especificamente quanto à fusão *CIITA::BCOR*, há relatos em sarcomas não uterinos de adultos, em trato sinusal, expandindo o espectro de neoplasias associadas a *BCOR* (121), e revisões/coortes de tumores com alterações em *BCOR* mencionam *CIITA::BCOR* entre os parceiros raros de fusão de *BCOR* em sarcomas indiferenciados (122). Entretanto, até o momento não há relatos robustos de *CIITA::BCOR* em SEE de alto grau e estudos adicionais, com validação molecular e avaliação de expressão, são necessários para esclarecer seu impacto diagnóstico e prognóstico.

Nesta coorte, observou-se que, entre as pacientes com Leiomiiossarcoma uterino, houve maior proporção de recidiva (59,1%), contrastando com o SEE de baixo grau, no qual a recidiva foi rara (apenas 13,3%). Já o SEE de alto grau apresentou uma taxa intermediária, com recidiva em 28,6% dos casos. Esses achados sugerem diferenças prognósticas relevantes entre os subtipos tumorais. Em relação à sobrevida livre de doença, observou-se diferenças relevantes no comportamento clínico entre os subtipos histológicos analisados, corroborando os dados de taxa de recidiva. A sobrevida livre de doença apresentou variação significativa entre os grupos ($p = 0,012$), sendo mais longa nos casos de SEE de baixo grau (média de 122,6 meses) e mais curta nos Leiomiiossarcomas (média de 46,8 meses; mediana de 28,5 meses). Já o SEE de alto grau apresentou um padrão intermediário. Este achado reflete a maior agressividade biológica dos Leiomiiossarcomas e a evolução mais indolente dos SEE de baixo grau.

A análise de sobrevida global, embora tenha demonstrado tendência semelhante, não atingiu significância estatística ($p = 0,063$). A média de

sobrevida global foi superior no SEE de baixo grau (119,2 meses) e inferior no Leiomiossarcoma (70,8 meses), mas a sobreposição dos intervalos de confiança e a censura dos dados podem ter limitado a detecção de diferenças significativas. Este resultado sugere que, mesmo diante de maior taxa de recorrência e menor sobrevida livre de doença, estratégias terapêuticas subsequentes e o tratamento de resgate podem atenuar o impacto na mortalidade global.

As taxas de recidiva corroboram os achados de sobrevida livre de doença: o Leiomiossarcoma apresentou a maior proporção de recorrências (59,1%), seguido do SEE de alto grau (28,6%), enquanto o SEE de baixo grau teve comportamento mais favorável (13,3%), com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,014$). Este padrão evidencia a heterogeneidade prognóstica desses tumores e reforça a importância de considerar o subtipo histológico como fator central na definição de estratégias terapêuticas e de seguimento.

O classificador de metilação de sarcomas de Heidelberg (versão v13.1), foi fundamentado em um conjunto de treinamento composto por 4.377 perfis de metilação de sarcomas e de tumores mesenquimais menos agressivos, organizados em 116 grupos tumorais e 4 grupos controles, que, por sua vez, originaram 93 classes de metilação distintas.

A construção do classificador baseou-se em técnicas de aprendizado de máquina, e sua performance foi rigorosamente avaliada por meio de validação cruzada em cinco etapas, alcançando 98% de acurácia em nível de classe e um escore de Brier de 0,017, o que demonstra a elevada qualidade e a boa calibração das estimativas de probabilidade obtidas.

Adicionalmente, o sistema gera uma saída hierárquica dos resultados, a qual permite uma interpretação mais abrangente e detalhada. Esse formato possibilita aos patologistas e clínicos a avaliação tanto do subtipo tumoral específico quanto das probabilidades agregadas em nível de classe, oferecendo suporte relevante para a tomada de decisão diagnóstica e terapêutica.

Neste estudo, 25 casos de sarcomas uterinos foram avaliados pelo perfil de metilação. Apesar da alta taxa de falha obtida nesse teste, provavelmente devido a dificuldades técnicas de processamento, em dois casos foi possível obter

melhor definição diagnóstica após o perfil de metilação. O perfil de metilação reclassificou 1 caso de LMS uterino em mixofibrossarcoma, além de outros três sarcomas, que foram reclassificados para sarcoma indiferenciado.

Diversos estudos relatam que, em termos genômicos, os sarcomas de partes moles podem ser divididos em dois grandes grupos: i. Sarcomas com alterações genéticas inespecíficas e complexas, caracterizados por cariótipos desbalanceados, como ocorre no leiomiossarcoma. ii. Sarcomas com alterações genéticas específicas e cariótipos relativamente simples, geralmente associados a fusões gênicas específicas ou mutações oncogênicas. Essa abordagem também foi realizada nessa casuística com o intuito de detectar diferenças prognósticas nesses dois grupos.

Observou-se que 82,5% dos pacientes do grupo "Fusão Gênica" permaneceram livres de recidiva em 36 meses, enquanto no grupo "Instabilidade Cromossômica" essa proporção foi de apenas 50,0%, em 36 meses. Esses achados estão de acordo com a literatura, mostrando que identificar corretamente o tipo de alteração driver permite que estratégias específicas sejam realizadas, trazendo benefícios clínicos para as pacientes.

Sarcomas uterinos com fusões gênicas bem definidas e validadas podem ser sensíveis a terapias específicas. Além disso, as fusões demonstram ser biomarcadores diagnósticos e prognósticos essenciais para o adequado tratamento e acompanhamento desses tumores, conforme demonstrado por esse estudo.

É importante destacar algumas limitações que podem influenciar a interpretação e o impacto dos resultados obtidos nesse estudo. Em primeiro lugar, o número relativamente reduzido de casos analisados representa um fator limitante, uma vez que uma casuística maior poderia conferir maior robustez estatística às associações observadas entre as alterações moleculares identificadas e os desfechos clínicos.

Além disso, a ausência de análises funcionais específicas para as fusões gênicas inéditas identificadas neste trabalho impede, neste momento, conclusões definitivas quanto ao seu papel biológico e relevância clínica. A

avaliação da expressão dos transcritos de fusão, bem como a realização de estudos ortogonais confirmatórios, como RT-PCR, será fundamental para validar esses achados. Pretende-se realizar estudos complementares nesse sentido para a futura publicação dos dados.

8. Conclusão

Este estudo buscou caracterizar molecularmente os sarcomas uterinos, gerando dados que possam orientar o tratamento e o seguimento clínico das pacientes oncológicas.

A análise clínico-epidemiológica dos casos diagnosticados e tratados no A.C.Camargo Cancer Center, no período de 2014 a 2024, mostrou que, embora não tenha sido identificada diferença estatisticamente significativa nas taxas de sobrevida global e livre de progressão, as pacientes com sarcomas uterinos associados à instabilidade cromossômica (leiomiossarcoma) apresentaram recidiva tumoral mais precoce em comparação àquelas cujo evento driver foi uma fusão gênica específica. Esse achado possui valor prognóstico e reforça a necessidade de um seguimento clínico mais rigoroso nesse subgrupo.

A utilização do perfil de metilação como ferramenta complementar ao diagnóstico conferiu maior robustez e segurança aos casos com diagnóstico já definido, além de permitir uma melhor classificação em situações de incerteza diagnóstica.

A identificação das fusões gênicas mais prevalentes nesta casuística, proveniente de um centro de referência nacional, fornece um panorama inédito do perfil molecular dos sarcomas uterinos no Brasil, contribuindo para o avanço do conhecimento nessa área. Além disso, as fusões gênicas inéditas detectadas neste estudo abrem caminho para investigações adicionais que possam validar tais achados, com potencial de se tornarem, no futuro, biomarcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos de resposta terapêutica.

9. Referências

1. Croce S, Devouassoux-Shisheboran M, Pautier P, Ray-Coquard I, Treilleux I, Neuville A, et al. Uterine sarcomas and rare uterine mesenchymal tumors with malignant potential. Diagnostic guidelines of the French Sarcoma Group and the Rare Gynecological Tumors Group. *Gynecol Oncol*. 2022;167(2):373–89.
2. Croce S, Chibon F. Molecular prognostication of uterine smooth muscle neoplasms: From CGH array to CINSARC signature and beyond. *Genes Chromosomes Cancer*. 2021 Mar 1;60(3):129–37.
3. Momeni-Boroujeni A, Chiang S. Uterine mesenchymal tumours: recent advances. *Histopathology*. 2020;76(1):64–75.
4. Croce S, Hostein I, Longacre TA, Mills AM, Pérot G, Devouassoux-Shisheboran M, et al. Uterine and vaginal sarcomas resembling fibrosarcoma: a clinicopathological and molecular analysis of 13 cases showing common NTRK-rearrangements and the description of a COL1A1-PDGFB fusion novel to uterine neoplasms. *Modern Pathology* [Internet]. 2019;32(7):1008–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-018-0184-6>
5. Watkins JA, Trotman J, Tadross JA, Harrington J, Hatcher H, Horan G, et al. Introduction and impact of routine whole genome sequencing in the diagnosis and management of sarcoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2024;131(5):860–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41416-024-02721-8>
6. Lin JF, Slomovitz BM. Uterine sarcoma 2008. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2008 [cited 2025 Sep 13];10(6):512–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18928666/>
7. Papatla K, Houck KL, Hernandez E, Chu C, Rubin S. Second primary uterine malignancies after radiation therapy for cervical cancer. *Arch Gynecol Obstet* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2025 Sep 13];300(2):389–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31069490/>
8. Silva EG, Tornos CS, Follen-Mitchell M. Malignant neoplasms of the uterine corpus in patients treated for breast carcinoma: the effects of tamoxifen. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 1994 [cited 2025 Sep 13];13(3):248–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7928058/>
9. Croce S, Ribeiro A, Brulard C, Noel JC, Amant F, Stoeckle E, et al. Uterine smooth muscle tumor analysis by comparative genomic hybridization: a useful diagnostic tool in challenging lesions. *Mod Pathol* [Internet]. 2015 Jul 2 [cited 2025 Sep 13];28(7):1001–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25932961/>
10. Croce S, Ducoulombier A, Ribeiro A, Lesluyes T, Noel JC, Amant F, et al. Genome profiling is an efficient tool to avoid the STUMP classification of uterine smooth muscle lesions: a comprehensive array-genomic hybridization analysis of 77 tumors. *Mod Pathol* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2025 Sep 13];31(5):816–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29327710/>

11. An Y, Wang S, Li S, Zhang L, Wang D, Wang H, et al. Distinct molecular subtypes of uterine leiomyosarcoma respond differently to chemotherapy treatment. *BMC Cancer* [Internet]. 2017 Sep 11 [cited 2025 Sep 13];17(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28893210/>
12. Yang CY, Liao JY, Huang WJ, Chang YT, Chang MC, Lee JC, et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes identified frequent TP53 and ATRX mutations in leiomyosarcoma. *Am J Transl Res* [Internet]. 2015 [cited 2025 Sep 13];7(10):2072–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26692951/>
13. S.A. Thiriyayi, G. Turashvili, E.K. Latta, et al., PLAG1-rearrangement in a uterine leiomyosarcoma with myxoid stroma and heterologous differentiation, *Genes Chromosom. Cancer* 60 (2021) 713–717.
14. S. Chiang, Recent advances in smooth muscle tumors with PGR and PLAG1 gene fusions and myofibroblastic uterine neoplasms, *Genes Chromosom. Cancer* 60 (2021) 138–146.
15. Oliva E. Practical issues in uterine pathology from banal to bewildering: the remarkable spectrum of smooth muscle neoplasia. *Mod Pathol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2025 Sep 13];29 Suppl 1(S1):S104–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26715170/>
16. Burch DM, Tavassoli FA. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus. *Histopathology* [Internet]. 2011 Dec [cited 2025 Sep 13];59(6):1144–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22175894/>
17. Kunzel KE, Mills NZ, Muderspach LI, D'Ablaing G. Myxoid Leiomyosarcoma of the Uterus. *Gynecol Oncol.* 1993 Feb;48(2):277–80.
18. Parra-Herran C, Schoolmeester JK, Yuan L, Cin PD, Fletcher CDM, Quade BJ, et al. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus: A clinicopathologic analysis of 30 cases and review of the literature with reappraisal of its distinction from other uterine myxoid mesenchymal neoplasms. *American Journal of Surgical Pathology.* 2016;40(3):285–301.
19. Mills AM, Longacre TA. Smooth Muscle Tumors of the Female Genital Tract. *Surg Pathol Clin* [Internet]. 2009 Dec [cited 2025 Sep 13];2(4):625–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26838774/>
20. Busca A, Parra-Herran C. Myxoid Mesenchymal Tumors of the Uterus: An Update on Classification, Definitions, and Differential Diagnosis. *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2017 [cited 2025 Sep 13];24(6):354–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28787279/>
21. Oliva E, Young RH, Amin MB, Clement PB. An immunohistochemical analysis of endometrial stromal and smooth muscle tumors of the uterus: a study of 54 cases emphasizing the importance of using a panel because of overlap in immunoreactivity for individual antibodies. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2002 [cited 2025 Sep 13];26(4):403–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11914617/>
22. Harano K, Hirakawa A, Yunokawa M, Nakamura T, Satoh T, Nishikawa T, et al. Prognostic factors in patients with uterine carcinosarcoma: a multi-institutional retrospective study from the Japanese Gynecologic Oncology Group. *Int J Clin Oncol.* 2016 Feb 1;21(1):168–76.
23. Pautier P, Genestie C, Rey A, Morice P, Roche B, Lhomme C, et al. Analysis of clinicopathologic prognostic factors for 157 uterine sarcomas

- and evaluation of a grading score validated for soft tissue sarcoma. *Cancer*. 2000 Mar 15;88(6):1425–31.
24. Major FJ, Blessing JA, Silverberg SG, Morrow CP, Creasman WT, Currie JL, et al. Prognostic factors in early-stage uterine sarcoma. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* [Internet]. 1993 [cited 2025 Sep 13];71(4 Suppl):1702–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8381710/>
 25. Chan JK, Kavar NM, Shin JY, Osann K, Chen LM, Powell CB, et al. Endometrial stromal sarcoma: a population-based analysis. *Br J Cancer* [Internet]. 2008 Oct 21 [cited 2025 Sep 13];99(8):1210–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18813312/>
 26. Riopel J, Plante M, Renaud MC, Roy M, Têtu B. Lymph node metastases in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Gynecol Oncol*. 2005;96(2):402–6.
 27. Dos Santos LA, Garg K, Diaz JP, Soslow RA, Hensley ML, Alektiar KM, et al. Incidence of lymph node and adnexal metastasis in endometrial stromal sarcoma. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2025 Sep 13];121(2):319–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21276609/>
 28. Shah JP, Bryant CS, Kumar S, Ali-Fehmi R, Malone JM, Morris RT. Lymphadenectomy and ovarian preservation in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Obstetrics and Gynecology*. 2008 Nov;112(5):1102–8.
 29. Batista LM, Carvalho CH, Acioly MA, Gharabaghi A, Ramina KF, Schittenhelm J, et al. Spinal metastasis of endometrial stromal sarcoma: clinicopathological features and management. *Surg Oncol* [Internet]. 2011 Jun [cited 2025 Sep 13];20(2):e78-83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071207>
 30. Chiang S, Ali R, Melnyk N, McAlpine JN, Huntsman DG, Gilks CB, et al. Frequency of known gene rearrangements in endometrial stromal tumors. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2025 Sep 13];35(9):1364–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21836477/>
 31. Cotzia P, Benayed R, Mullaney K, Oliva E, Felix A, Ferreira J, et al. Undifferentiated Uterine Sarcomas Represent Under-Recognized High-grade Endometrial Stromal Sarcomas. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2025 Sep 13];43(5):662–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30789359/>
 32. Dickson BC, Lum A, Swanson D, Bernardini MQ, Colgan TJ, Shaw PA, et al. Novel EPC1 gene fusions in endometrial stromal sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2025 Sep 13];57(11):598–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30144186/>
 33. Brunetti M, Gorunova L, Davidson B, Heim S, Panagopoulos I, Micci F. Identification of an EPC2-PHF1 fusion transcript in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Oncotarget* [Internet]. 2018 Apr 10 [cited 2025 Sep 13];9(27):19203–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29721194/>
 34. Micci F, Brunetti M, Dal Cin P, Nucci MR, Gorunova L, Heim S, et al. Fusion of the genes BRD8 and PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2025 Sep

- 13];56(12):841–5. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28758277/>
35. Dewaele B, Przybyl J, Quattrone A, Finalet Ferreira J, Vanspauwen V, Geerdens E, et al. Identification of a novel, recurrent MBTD1-CXorf67 fusion in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Int J Cancer* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2025 Sep 13];134(5):1112–22. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23959973/>
 36. Micci F, Walter CU, Teixeira MR, Panagopoulos I, Bjerkehagen B, Sæter G, et al. Cytogenetic and molecular genetic analyses of endometrial stromal sarcoma: Nonrandom involvement of chromosome arms 6p and 7p and confirmation of JAZF1/JJAZ1 gene fusion in t(7;17). *Cancer Genet Cytogenet* [Internet]. 2003 Jul 15 [cited 2025 Sep 13];144(2):119–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12850374/>
 37. Koontz JI, Soreng AL, Nucci M, Kuo FC, Pauwels P, Van Den Berghe H, et al. Frequent fusion of the JAZF1 and JJAZ1 genes in endometrial stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 May 22 [cited 2025 Sep 13];98(11):6348–53. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11371647/>
 38. F. Micci, S. Heim, I. Panagopoulos, Molecular pathogenesis and prognostication of “low-grade” and “high-grade” endometrial stromal sarcoma, *Genes Chromosom. Cancer* 60 (2021) 160–167.
 39. Hrzenjak A, Moinfar F, Tavassoli FA, Strohmeier B, Kremser ML, Zatloukal K, et al. JAZF1/JJAZ1 gene fusion in endometrial stromal sarcomas: molecular analysis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction optimized for paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* [Internet]. 2005 [cited 2025 Sep 13];7(3):388–95. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16049311/>
 40. Chu PG, Arber DA, Weiss LM, Chang KL. Utility of CD10 in distinguishing between endometrial stromal sarcoma and uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical comparison of 34 cases. *Mod Pathol* [Internet]. 2001 May [cited 2025 Sep 13];14(5):465–71. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11353058/>
 41. Baker P, Oliva E. Endometrial stromal tumours of the uterus: a practical approach using conventional morphology and ancillary techniques. *J Clin Pathol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2025 Sep 13];60(3):235–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17347285/>
 42. Abeler VM, Røyne O, Thoresen S, Danielsen HE, Nesland JM, Kristensen GB. Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients. *Histopathology* [Internet]. 2009 Feb [cited 2025 Sep 13];54(3):355–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19236512/>
 43. Ferreira J, Félix A, Lennerz JK, Oliva E. Recent advances in the histological and molecular classification of endometrial stromal neoplasms. *Virchows Arch* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2025 Sep 13];473(6):665–78. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30324234/>
 44. Kommoss FKF, Chang KTE, Stichel D, Banito A, Jones DTW, Heilig CE, et al. Endometrial stromal sarcomas with BCOR-rearrangement harbor MDM2 amplifications. *J Pathol Clin Res* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2025

- Sep 13];6(3):178–84. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32352245/>
45. Sciallis AP, Bedroske PP, Schoolmeester JK, Sukov WR, Keeney GL, Hodge JC, et al. High-grade endometrial stromal sarcomas: a clinicopathologic study of a group of tumors with heterogeneous morphologic and genetic features. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2014 [cited 2025 Sep 13];38(9):1161–72. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25133706/>
 46. Chiang S, Lee CH, Stewart CJR, Oliva E, Hoang LN, Ali RH, et al. BCOR is a robust diagnostic immunohistochemical marker of genetically diverse high-grade endometrial stromal sarcoma, including tumors exhibiting variant morphology. *Modern Pathology*. 2017 Sep 1;30(9):1251–61.
 47. Mariño-Enriquez A, Lauria A, Przybyl J, Ng TL, Kowalewska M, Debiec-Rychter M, et al. BCOR Internal Tandem Duplication in High-grade Uterine Sarcomas. *American Journal of Surgical Pathology*. 2018;42(3):335–41.
 48. Sciallis AP, Bedroske PP, Schoolmeester JK, Sukov WR, Keeney GL, Hodge JC, et al. High-grade endometrial stromal sarcomas: A clinicopathologic study of a group of tumors with heterogeneous morphologic and genetic features. *American Journal of Surgical Pathology*. 2014;38(9):1161–72.
 49. Cotzia P, Benayed R, Mullaney K, Oliva E, Felix A, Ferreira J, et al. Undifferentiated Uterine Sarcomas Represent Under-Recognized High-grade Endometrial Stromal Sarcomas. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2025 Sep 13];43(5):662–9. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30789359/>
 50. Allen AJ, Ali SM, Gowen K, Elvin JA, Pejovic T. A recurrent endometrial stromal sarcoma harbors the novel fusion JAZF1-BCORL1. *Gynecol Oncol Rep* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2025 Sep 13];20:51–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28331900/>
 51. Dickson BC, Lum A, Swanson D, Bernardini MQ, Colgan TJ, Shaw PA, et al. Novel EPC1 gene fusions in endometrial stromal sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2025 Sep 13];57(11):598–603. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30144186/>
 52. Lee CH, Mariño-Enriquez A, Ou W, Zhu M, Ali RH, Chiang S, et al. The clinicopathologic features of YWHAE-FAM22 endometrial stromal sarcomas: a histologically high-grade and clinically aggressive tumor. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2012 May [cited 2025 Sep 13];36(5):641–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22456610/>
 53. Lee CH, Nucci MR. Endometrial stromal sarcoma--the new genetic paradigm. *Histopathology* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2025 Sep 13];67(1):1–19. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25355621/>
 54. Lewis N, Soslow RA, Delair DF, Park KJ, Murali R, Hollmann TJ, et al. ZC3H7B-BCOR high-grade endometrial stromal sarcomas: a report of 17 cases of a newly defined entity. *Mod Pathol* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2025 Sep 13];31(4):674–84. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29192652/>

55. Croce S, Hostein I, Ribeiro A, Garbay D, Velasco V, Stoeckle E, et al. YWHAE rearrangement identified by FISH and RT-PCR in endometrial stromal sarcomas: genetic and pathological correlations. *Mod Pathol* [Internet]. 2013 Oct [cited 2025 Sep 13];26(10):1390–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23599159/>
56. Marinõ-Enriquez A, Lauria A, Przybyl J, Ng TL, Kowalewska M, Debiec-Rychter M, et al. BCOR Internal Tandem Duplication in High-grade Uterine Sarcomas. *American Journal of Surgical Pathology*. 2018;42(3):335–41.
57. Chiang S, Lee CH, Stewart CJR, Oliva E, Hoang LN, Ali RH, et al. BCOR is a robust diagnostic immunohistochemical marker of genetically diverse high-grade endometrial stromal sarcoma, including tumors exhibiting variant morphology. *Mod Pathol* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2025 Sep 13];30(9):1251–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28621321/>
58. Marinõ-Enriquez A, Lauria A, Przybyl J, Ng TL, Kowalewska M, Debiec-Rychter M, et al. BCOR Internal Tandem Duplication in High-grade Uterine Sarcomas. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2018 [cited 2025 Sep 13];42(3):335–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29200103/>
59. Lee CH, Hoang LN, Yip S, Reyes C, Marino-Enriquez A, Eilers G, et al. Frequent expression of KIT in endometrial stromal sarcoma with YWHAE genetic rearrangement. *Mod Pathol* [Internet]. 2014 [cited 2025 Sep 13];27(5):751–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24186140/>
60. Hemming ML, Wagner AJ, Nucci MR, Chiang S, Wang L, Hensley ML, et al. YWHAE-rearranged high-grade endometrial stromal sarcoma: Two-center case series and response to chemotherapy. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2025 Sep 13];145(3):531–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28390819/>
61. Chiang S, Cotzia P, Hyman DM, Drilon A, Tap WD, Zhang L, et al. NTRK Fusions Define a Novel Uterine Sarcoma Subtype With Features of Fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2018 [cited 2025 Sep 13];42(6):791–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29553955/>
62. Costigan DC, Nucci MR, Dickson BC, Chang MC, Song S, Sholl LM, et al. NTRK -Rearranged Uterine Sarcomas: Clinicopathologic Features of 15 Cases, Literature Review, and Risk Stratification. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2025 Sep 13];46(10):1415–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35713627/>
63. Chiang S. S100 and Pan-Trk Staining to Report NTRK Fusion-Positive Uterine Sarcoma: Proceedings of the ISGyP Companion Society Session at the 2020 USCAP Annual Meeting. *Int J Gynecol Pathol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2025 Sep 13];40(1):24–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33290352/>
64. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med* [Internet]. 2018 Feb 22 [cited 2025 Sep 13];378(8):731–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29466156/>

65. Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKING down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov* [Internet]. 2015 [cited 2025 Sep 13];5(1):25–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25527197/>
66. Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M, Iafrate AJ, Bibeau F, Dietel M, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol* [Internet]. 2019 Sep 1 [cited 2025 Sep 13];30(9):1417–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31268127/>
67. Rohrberg KS, Lassen U. Detecting and Targeting NTRK Fusions in Cancer in the Era of Tumor Agnostic Oncology. *Drugs*. 2021 Mar 1;81(4):445–52.
68. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, et al. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med* [Internet]. 2013 Nov [cited 2025 Sep 13];19(11):1469–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24162815/>
69. Buckley J, Schmidt RJ, Ostrow D, Maglinte D, Bootwalla M, Ruble D, et al. An Exome Capture-Based RNA-Sequencing Assay for Genome-Wide Identification and Prioritization of Clinically Important Fusions in Pediatric Tumors. *J Mol Diagn* [Internet]. 2024 Feb 1 [cited 2025 Sep 13];26(2):127–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38008288/>
70. Liu Y, Klein J, Bajpai R, Dong L, Tran Q, Kolekar P, et al. Etiology of oncogenic fusions in 5,190 childhood cancers and its clinical and therapeutic implication. *Nat Commun* [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2025 Sep 13];14(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37019972/>
71. Tuna M, Amos CI, Mills GB. Molecular mechanisms and pathobiology of oncogenic fusion transcripts in epithelial tumors. *Oncotarget* [Internet]. 2019 [cited 2025 Sep 13];10(21):2095–111. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31007851/>
72. Saliba J, Church AJ, Rao S, Danos A, Furtado L V., Laetsch T, et al. Standardized evidence-based approach for assessment of oncogenic and clinical significance of NTRK fusions. *Cancer Genet* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2025 Sep 13];264–265:50–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35366592/>
73. Aepala MR, Peiris MN, Jiang Z, Yang W, Meyer AN, Donoghue DJ. Nefarious NTRK oncogenic fusions in pediatric sarcomas: Too many to Trk. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Sep 13];68:93–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36153202/>
74. Gao Y, He XY, Wu XS, Huang YH, Toneyan S, Ha T, et al. ETV6 dependency in Ewing sarcoma by antagonism of EWS-FLI1-mediated enhancer activation. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2025 Sep 13];25(2):298–308. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36658219/>
75. Górecki M, Koziół I, Kopystiecka A, Budzyńska J, Zawitkowska J, Lejman M. Updates in KMT2A Gene Rearrangement in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biomedicines* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 Sep 13];11(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36979800/>

76. Sameeta F, Wang SA, Tang Z, Khoury JD, Fang H, Wang D, et al. Integrative immunophenotypic and genetic characterization of acute myeloid leukemia with CBFB rearrangement. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2024 Nov 1 [cited 2025 Sep 13];162(5):455–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38801226/>
77. Malik F, Furtado L V., Eldomery MK, Shi Z, Koo SC. Pediatric NCOA3-rearranged low-grade fibroblastic tumor with nuclear beta-catenin immunoreactivity. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2024 Feb 1 [cited 2025 Sep 13];63(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38340030/>
78. Lieber MR. Mechanisms of human lymphoid chromosomal translocations. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2016 May 25 [cited 2025 Sep 13];16(6):387–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27220482/>
79. Thomson A, Rehn J, Yeung D, Breen J, White D. Deciphering IGH rearrangement complexity and detection strategies in acute lymphoblastic leukaemia. *NPJ Precis Oncol* [Internet]. 2025 Dec 1 [cited 2025 Sep 13];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40185891/>
80. Laetsch TW, Dubois SG, Bender JG, Macy ME, Moreno L. Opportunities and Challenges in Drug Development for Pediatric Cancers. *Cancer Discov* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2025 Sep 13];11(3):545–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33277309/>
81. Koelsche C, Schrimpf D, Stichel D, Sill M, Sahm F, Reuss DE, et al. Sarcoma classification by DNA methylation profiling. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Sep 13];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33479225/>
82. Løkk K, Modhukur V, Rajashekar B, Märtens K, Mägi R, Kolde R, et al. DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biol* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2025 Sep 13];15(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24690455/>
83. Kommos FKF, Stichel D, Schrimpf D, Kriegsmann M, Tessier-Cloutier B, Talhouk A, et al. DNA methylation-based profiling of uterine neoplasms: a novel tool to improve gynecologic cancer diagnostics. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2025 Sep 13];146(1):97–104. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31768620/>
84. Hasan NM, Sharma A, Ruzgar NM, Deshpande H, Olino K, Khan S, et al. Epigenetic signatures differentiate uterine and soft tissue leiomyosarcoma. *Oncotarget* [Internet]. 2021 Aug 3 [cited 2025 Sep 13];12(16):1566–79. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34381562/>
85. Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M, Iafrate AJ, Bibeau F, Dietel M, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Annals of Oncology*. 2019;30(9):1417–27.
86. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Modern Pathology* [Internet]. 2019;32(1):147–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-018-0118-3>
87. Al M et. Moura et al. Pan-TRK immunohistochemistry in gynaecological mesenchymal tumours: diagnostic implications and pitfalls.

- Histopathology. 2024 Feb;84(3):451-462. doi: 10.1111/his.15082. Epub 2023 Nov 21. Histopathology.
88. Chiang S. S100 and pan-trk staining to report NTRK fusion-positive uterine sarcoma: Proceedings of the ISGyP companion society session at the 2020 USCAP annual meeting. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2021;40(1):24–7.
 89. Mosele MF, Westphalen CB, Stenzinger A, Barlesi F, Bayle A, Bièche I, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with advanced cancer in 2024: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* [Internet]. 2024 Jul 1 [cited 2025 Sep 13];35(7):588–606. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38834388/>
 90. Pekova B, Sykorova V, Mastnikova K, Vaclavikova E, Moravcova J, Vlcek P, et al. NTRK Fusion Genes in Thyroid Carcinomas: Clinicopathological Characteristics and Their Impacts on Prognosis. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Apr 2 [cited 2025 Sep 13];13(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33923728/>
 91. Costigan DC, Nucci MR, Dickson BC, Chang MC, Song S, Sholl LM, et al. NTRK-Rearranged Uterine Sarcomas : Clinicopathologic Features of 15 cases, Literature Review, and Risk stratification. *Am J Surg Pathol*. 2022;46(10):1415–29.
 92. Jäger N, Reuss DE, Sill M, Schrimpf D, Suwala AK, Sievers P, et al. Advancing sarcoma diagnostics with expanded DNA methylation-based classification [Internet]. 2025. Available from: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2025.06.30.25330543>
 93. Lin JF, Slomovitz BM. Uterine sarcoma 2008. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2008 [cited 2025 Sep 18];10(6):512–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18928666/>
 94. Wang WL, Soslow R, Hensley M, Asad H, Zannoni GF, De Nictolis M, et al. Histopathologic prognostic factors in stage I leiomyosarcoma of the uterus: a detailed analysis of 27 cases. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2025 Sep 18];35(4):522–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21383611/>
 95. Yang CY, Liao JY, Huang WJ, Chang YT, Chang MC, Lee JC, et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes identified frequent TP53 and ATRX mutations in leiomyosarcoma. *Am J Transl Res* [Internet]. 2015 [cited 2025 Sep 18];7(10):2072–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26692951/>
 96. An Y, Wang S, Li S, Zhang L, Wang D, Wang H, et al. Distinct molecular subtypes of uterine leiomyosarcoma respond differently to chemotherapy treatment. *BMC Cancer* [Internet]. 2017 Sep 11 [cited 2025 Sep 18];17(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28893210/>
 97. Panwar V, Liu Y, Gwin K, Chen H. COL1A1-PDGFB Fusion Associated Fibrosarcoma of the Uterine Corpus: A Case Report and Literature Review. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2023 Mar 1;42(2):143–6.
 98. Lu L, Wang S, Shen H, Zhang F, Ma F, Shi Y, et al. Case Report: A case of COL1A1- PDGFB fusion uterine sarcoma at cervix and insights into the clinical management of rare uterine sarcoma. *Front Oncol* [Internet]. 2023

- [cited 2025 Sep 18];13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36994196/>
99. Wachtel M, Surdez D, Grünewald TGP, Schäfer BW. Functional Classification of Fusion Proteins in Sarcoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2025 Sep 18];16(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38611033/>
 100. Zhang J, Huang J, Liu W, Ding L, Cheng D, Xiao H. Identification of Common Oncogenic Genes and Pathways Both in Osteosarcoma and Ewing's Sarcoma Using Bioinformatics Analysis. *J Immunol Res* [Internet]. 2022 [cited 2025 Sep 18];2022. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35578666/>
 101. Omar R, Cooper A, Maranyane HM, Zerbini L, Prince S. COL1A2 is a TBX3 target that mediates its impact on fibrosarcoma and chondrosarcoma cell migration. *Cancer Lett* [Internet]. 2019 Sep 10 [cited 2025 Sep 18];459:227–39. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31202624/>
 102. Batkovskytė D, Swolin-Eide D, Hammarsjö A, Sæther KB, Thunström S, Lundin J, et al. Structural Variants in COL1A1 and COL1A2 in Osteogenesis Imperfecta. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2025 Mar 1 [cited 2025 Sep 18];197(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39513464/>
 103. Riggio AI, Blyth K. The enigmatic role of RUNX1 in female-related cancers - current knowledge & future perspectives. *FEBS J* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2025 Sep 18];284(15):2345–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28304148/>
 104. Mitra S, Farswan A, Piccinelli P, Sydow S, Hesla A, Tsagkozis P, et al. Transcriptomic profiles of myxofibrosarcoma and undifferentiated pleomorphic sarcoma correlate with clinical and genomic features. *J Pathol* [Internet]. 2024 Nov 1 [cited 2025 Sep 18];264(3):293–304. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39258383/>
 105. Chiang S, Ali R, Melnyk N, McAlpine JN, Huntsman DG, Gilks CB, et al. Frequency of known gene rearrangements in endometrial stromal tumors. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2011 Sep [cited 2025 Sep 18];35(9):1364–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21836477/>
 106. Panagopoulos I, Micci F, Thorsen J, Gorunova L, Eibak AM, Bjerkehagen B, et al. Novel fusion of MYST/Esa1-associated factor 6 and PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jun 22 [cited 2025 Sep 18];7(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22761769/>
 107. Panagopoulos I, Mertens F, Griffin CA. An endometrial stromal sarcoma cell line with the JAZF1/PHF1 chimera. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008 Sep;185(2):74–7.
 108. Micci F, Gorunova L, Gatus S, Matias-Guiu X, Davidson B, Heim S, et al. MEAF6/PHF1 is a recurrent gene fusion in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Lett* [Internet]. 2014 May 28 [cited 2025 Sep 18];347(1):75–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24530230/>
 109. Abeler VM, Røyne O, Thoresen S, Danielsen HE, Nesland JM, Kristensen GB. Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients.

- Histopathology [Internet]. 2009 Feb [cited 2025 Sep 18];54(3):355–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19236512/>
110. Zhou T, Yi F, Wang Z, Guo Q, Liu J, Bai N, et al. The Functions of DNA Damage Factor RNF8 in the Pathogenesis and Progression of Cancer. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2019 [cited 2025 Sep 18];15(5):909–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31182912/>
 111. Mastrocola AS, Kim SH, Trinh AT, Rodenkirch LA, Tibbetts RS. The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. *J Biol Chem* [Internet]. 2013 Aug 23 [cited 2025 Sep 18];288(34):24731–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23833192/>
 112. S M, D G, MR B, YP L, F DC, T F, et al. FET fusion oncoproteins disrupt physiologic DNA repair and create a targetable opportunity for ATR inhibitor therapy. *bioRxiv* [Internet]. 2025 May 16 [cited 2025 Sep 18]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37205599/>
 113. Ramdzan ZM, Nepveu A. CUX1, a haploinsufficient tumour suppressor gene overexpressed in advanced cancers. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2025 Sep 18];14(10):673–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25190083/>
 114. Massoth LR, Hung YP, Ferry JA, Hassserjian RP, Nardi V, Nielsen GP, et al. Histiocytic and Dendritic Cell Sarcomas of Hematopoietic Origin Share Targetable Genomic Alterations Distinct from Follicular Dendritic Cell Sarcoma. *Oncologist* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2025 Sep 18];26(7):e1263–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33904632/>
 115. Wachtel M, Surdez D, Grünwald TGP, Schäfer BW. Functional Classification of Fusion Proteins in Sarcoma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2025 Sep 18];16(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38611033/>
 116. Panagopoulos I, Thorsen J, Gorunova L, Haugom L, Bjerkehagen B, Davidson B, et al. Fusion of the ZC3H7B and BCOR genes in endometrial stromal sarcomas carrying an X;22-translocation. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2013 Jul [cited 2025 Sep 18];52(7):610–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23580382/>
 117. Marinõ-Enriquez A, Lauria A, Przybyl J, Ng TL, Kowalewska M, Debiec-Rychter M, et al. BCOR Internal Tandem Duplication in High-grade Uterine Sarcomas. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2018 [cited 2025 Sep 18];42(3):335–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29200103/>
 118. Lee CH, Ou W Bin, Mariño-Enriquez A, Zhu M, Mayeda M, Wang Y, et al. 14-3-3 fusion oncogenes in high-grade endometrial stromal sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Jan 17 [cited 2025 Sep 18];109(3):929–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22223660/>
 119. Londhe P, Zhu B, Abraham J, Keller C, Davie J. CIITA is silenced by epigenetic mechanisms that prevent the recruitment of transactivating factors in rhabdomyosarcoma cells. *Int J Cancer* [Internet]. 2012 Aug 15 [cited 2025 Sep 22];131(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21989738/>

120. Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* [Internet]. 2011 Mar 17 [cited 2025 Sep 22];471(7338):377–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21368758/>
121. Yoshida A, Arai Y, Hama N, Chikuta H, Bando Y, Nakano S, et al. Expanding the clinicopathologic and molecular spectrum of BCOR-associated sarcomas in adults. *Histopathology* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2025 Sep 22];76(4):509–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31647130/>
122. Kao YC, Sung YS, Argani P, Swanson D, Alaggio R, Tap W, et al. NTRK3 overexpression in undifferentiated sarcomas with YWHAE and BCOR genetic alterations. *Mod Pathol* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2025 Sep 22];33(7):1341–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32034283/>