

Lucas Faria Abrahão Machado

**Pesquisa de biomarcadores como fator prognóstico
nos tumores da família do sarcoma de Ewing**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Machado, Lucas Faria Abrahão

Pesquisa de biomarcadores como fator prognóstico nos tumores da família do sarcoma de Ewing / Lucas Faria Abrahão Machado -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.
Orientador: Olavo Pires de Camargo.

Descritores: 1.Tumores 2.Sarcoma de Ewing 3.Tumores neuroectodérmicos primitivos 4.Biomarcadores 5.Imuno-histoquímica 6.Prognósticos

USP/FM/DBD-200/17

Aos meus pais, Eduardo e Áurea, meus maiores exemplos, pelo carinho e dedicação na minha educação e por sempre estimularem a minha busca pelo conhecimento.

Às minhas irmãs, Eduarda e Elaine, pelo companheirismo e amizade de uma vida toda.

À minha Marília, esposa e melhor amiga, por seu amor, compreensão e apoio incondicional.

Às minhas pequenas Julia e Sofia, minhas fontes de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela liberdade e confiança depositadas.

À Dra. Renee Zon Fillipi, pelo valioso apoio desde os momentos iniciais.

Ao ortopedista oncológico Dr. Bruno Pereira Antunes, pelo entusiasmo e colaboração na coleta dos dados clínicos.

Ao colega patologista e amigo, Dr. Cristovam Scapulatempo Neto, pelo enorme incentivo.

À equipe do Departamento de Patologia e do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos, em especial Bia, Paty, Guilherme e Renato, pelo auxílio na confecção dos TMAs e reações imuno-histoquímicas.

Aos pesquisadores Rui Manuel Reis e Céline Pinheiro, pelo auxílio importante no desenvolvimento desta pesquisa.

À equipe do Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB) do Hospital de Câncer de Barretos, especialmente Cleyton e Lívia, pelo suporte e dedicação na consistência e análise dos dados.

À Tania Borges e Rosana Costa, secretárias da pós-graduação do IOT-HCFMUSP, por todo o suporte e eficiência durante todo o processo.

Aos meus colegas patologistas do Hospital de Câncer de Barretos, especialmente Dra. Sandra Morini, pela parceria e suporte durante o projeto.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Quem escolheu a busca
não pode recusar a travessia.”*

(Alfredo Bosi)

NORMALIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Estrutura e apresentação: Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos: *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Vocabulário ortográfico da língua portuguesa, 5a edição, 2009, elaborado pela Academia Brasileira de Letras, em consonância com o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, promulgado pelo Decreto Federal nº 6.583/2008.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE GRÁFICOS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo primário	8
2.2 Objetivos secundários	8
3 REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1 Biomarcadores em câncer	10
3.2 Biomarcadores em TFSE	11
3.2.1 MTAP	13
3.2.2 p16	14
3.2.3 Ciclina D1	15
3.2.4 PTEN	16
3.2.5 p53	17
3.2.6 STAG2	19
3.2.7 USP22	20
3.2.8 OCT4	21
3.2.9 SALL4	22
3.2.10 RKIP	23
3.2.11 Brachyury	24
3.2.12 MCTs e CD147	25
3.2.13 GLUT1 e CAIX	27
3.2.14 PD-L1	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Amostras tumorais	31
4.2 TMAs	32
4.3 Estudo Imuno-histoquímico	33

4.4 Dados clínico-demográficos.....	37
4.5 Estatística.....	39
4.6 Ética na pesquisa.....	40
5 RESULTADOS	42
5.1 Caracterização da amostra	43
5.2 Estudo dos pontos de corte dos biomarcadores	46
5.3 Resultados do estudo imuno-histoquímico.....	47
5.4 Associação dos biomarcadores com dados clínico-patológicos.....	52
5.5 Associação dos biomarcadores com o prognóstico	56
5.5.1 Análise simples	56
5.5.2 Análise múltipla.....	62
6 DISCUSSÃO	63
6.1 Caracterização geral da casuística	64
6.2 Caracterização geral dos biomarcadores.....	71
6.3 Associação dos biomarcadores com dados clínico-patológicos.....	74
6.4 Biomarcadores como fator prognóstico.....	75
7 CONCLUSÕES	81
8 ANEXOS	83
Anexo A - Ficha de coleta para dados clínico-demográficos	84
Anexo B - Parecer consubstanciado do CEP elaborado pelo Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo	86
Anexo C - Parecer consubstanciado do CEP elaborado pelo Hospital de Câncer de Barretos	88
REFERÊNCIAS.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'-FU - 5'- fluorouracil

ALK - do inglês *Anaplastic lymphoma kinase*

AZA - Azathioprine

CAIX - Anidrase carbônica IX

CCN3 - do inglês *Cysteine-rich, Connective tissue growth factor and Nephroblastoma overexpressed protein 3*

CD147 - do inglês *Clustering of Differentiation 147*

CDKN2 - do inglês *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2*

CDK4 - do inglês *Cyclin Dependent Kinase 4*

C-KIT - do inglês *Proto-Oncogene Receptor Tyrosine Kinase*

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *desoxyribonucleic acid*

EGFR - Receptor de fator de crescimento epidermal, do inglês *Epidermal growth factor receptor*

ETS - Fator de transcrição E-Twenty-Six

EWSR1 - do inglês *EWS (Ewing Sarcoma) RNA Binding Protein 1*

FISH - Hibridização in situ por fluorescência

FLI1 - do inglês *Friend Leukemia Integration 1 transcription factor*

GIST - Tumor estromal gastrointestinal

GLUT1 - Transportador de glicose 1

H&E - Hematoxilina e Eosina

HCB - Hospital de Câncer de Barretos

HER2 - Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HIF-1 - Fator-1 indutível por hipóxia

IC - Intervalo de confiança

IHQ - Imuno-histoquímica

MCT - Transportador de monocarboxilatos

MTA-1 - do inglês *Manual Tissue Arrayer*

MTAP - Metiltioadenosina fosforilase

MTX - Metotrexate

NCI - Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos

NEB - Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística

NF-κB - Fator nuclear kappa B

NIH - National Institutes of Health

OCT4 - Fator de transcrição octâmero de ligação 4

PD-1 - do inglês *Programmed death 1*

PD-L1 - do inglês *Programmed Death-Ligand 1*

PNET - Tumor neuroectodérmico primitivo

PTEN - do inglês *Phosphatase and Tensin Homologue*

RE - Receptor de estrógeno

RKIP - Proteína inibitória da quinase Raf

ROC - do inglês *Receiver operating characteristic*

RP - Receptor de progesterona

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa

SAGA - do inglês *Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase complex*

SALL4 - do inglês *Spalt-like 4*

SAME- Serviço de Arquivo Médico e Estatístico

SE - Sarcoma de Ewing

SEE - Sarcoma de Ewing extra-esquelético

SEER - Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais

SNC - Sistema nervoso central

STAG2 - do inglês *Stromal Antigen 2*

SUS - Sistema Único de Saúde

TET/FET - iniciais de TAF15,EWS,TLS//FUS,EWS,TLS

TFSE - Tumores da família do sarcoma de Ewing

TMA - Microarranjo tecidual, do inglês *Tissue microarray*

TNM - Classificação de tumores malignos (T=tumor, N=node, M=metastasis)

USP22 - Protease ubiquitina-específica 22

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Dr. James Ewing	3
Figura 2 - Aspectos histológicos clássicos de um TFSE	4
Figura 3 - Características imuno-histoquímicas dos TFSE.....	4
Figura 4 - Variações histológicas dos TFSE.....	5
Figura 5 - Via metabólica do MTAP	14
Figura 6 - Relação de Ciclina D1 e p16 no ciclo celular	15
Figura 7 - Via PI3K-PTEN-Akt	17
Figura 8 - As múltiplas respostas de p53	18
Figura 9 - Modelo do complexo de coesina.....	20
Figura 10 - O papel de USP22 no complexo SAGA	21
Figura 11 - OCT4, SALL4 e células-tronco.....	22
Figura 12 - A cascata de sinalização intracelular Ras/Raf/MEK/ERK	24
Figura 13 - Brachyury e transição epitelial-mesenquimal	25
Figura 14 - Transportadores de monocarboxilatos (MCTs) e marcadores de hipóxia no metabolismo energético tumoral	27
Figura 15 - O eixo PD1/PD-L1	29
Figura 16 - Imagens de exemplares dos marcadores citoplasmáticos	49
Figura 17 - Imagens de exemplares positivos dos marcadores de membrana	50
Figura 18 - Fotografia de um caso classificado como positivo para PD-L1	51
Figura 19 - Imagens de exemplares dos marcadores nucleares	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier	46
Gráfico 2 - Curvas de sobrevida global para o biomarcador MTAP	57
Gráfico 3 - Curvas de sobrevida global para o biomarcador p53	57
Gráfico 4 - Curvas de sobrevida global para o biomarcador USP22	58
Gráfico 5 - Curvas de sobrevida global para o biomarcador MCT1	58
Gráfico 6 - Curvas de sobrevida global para o biomarcador GLUT1	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos anticorpos e metodologias	34
Tabela 2 - Características clínico-patológicas dos pacientes com TFSE.....	45
Tabela 3 - Pontos de corte dos anticorpos de acordo com a probabilidade preditiva de prognóstico	47
Tabela 4 - Associação entre dados clínico-patológicos e p53, USP22, MCT2, GLUT1 e Brachyury.....	53
Tabela 5 - Associação entre dados clínico-patológicos e os demais biomarcadores.....	55
Tabela 6 - Probabilidade de sobrevida global dos pacientes com TFSE para a expressão dos biomarcadores MTAP, p53, USP22, MCT1 e GLUT1	56
Tabela 7 - Probabilidade de sobrevida global dos pacientes com TFSE para a expressão dos demais biomarcadores.....	60
Tabela 8 - Sobrevida global para as características clínico-patológicas.....	61
Tabela 9 - Risco Relativo pelo Modelo de Cox Múltiplo para sobrevida global	62

RESUMO

Machado LFA. *Pesquisa de biomarcadores como fator prognóstico nos tumores da família do sarcoma de Ewing* [tese]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

INTRODUÇÃO: Os tumores da família do sarcoma de Ewing (TFSE) compreendem um espectro de neoplasias de células neuroectodérmicas dos ossos e partes moles de comportamento biológico agressivo e prognóstico reservado, caracterizadas por translocações envolvendo um dos genes da família TET/FET e um dos genes da família ETS, mais comumente EWSR1 e FLI1. Com o avanço da medicina personalizada, cresce a demanda por biomarcadores em TFSE que tenham valor como fatores prognósticos e potencial para futuras terapias-alvo específicas. Este estudo propôs a avaliação da expressão proteica de diferentes classes de biomarcadores, incluindo proteínas relacionadas à supressão tumoral, proliferação celular, metabolismo energético, atividade imune, vias de reparo do DNA e células tronco.

MÉTODOS: A expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores MTAP, p16, STAG2, p53, USP22, PTEN, RKIP, Ciclina D1, MCTs (1, 2 e 4), CD147, CA IX, GLUT1, BRACHYURY, PD-L1, OCT4 e SALL4 foi analisada em uma série bem caracterizada de 113 TFSE através de amostras em tissue microarrays (TMA). Os perfis de expressão foram então associados aos parâmetros clínico-patológicos dos pacientes e à sobrevida global para uma análise do impacto no prognóstico. **RESULTADOS:** A hiperexpressão de p53 mostrou associação estatisticamente significativa com menor sobrevida global ($p < 0,001$), doença metastática no diagnóstico ($p = 0,017$) e idade acima de 20 anos ($p = 0,04$). A perda de expressão de MTAP ($p = 0,039$) e de Brachyury ($p = 0,008$) também se associaram significativamente com menor sobrevida global. Em relação às características clínicas dos pacientes, doença metastática no diagnóstico e etnia não-branca foram associados a um pior prognóstico. **CONCLUSÕES:** Os biomarcadores p53, MTAP e Brachyury foram identificados como fatores independentes relacionados ao prognóstico. A utilização destes biomarcadores como fator prognóstico nos TFSE pode auxiliar na estratificação de risco dos pacientes e até mesmo estimular o desenvolvimento de drogas-alvo específicas.

DESCRITORES: 1.Tumores neuroectodérmicos 2.Sarcoma de Ewing 3.Tumores primitivos 4.Biomarcadores 5.Imuno-histoquímica 6.Prognósticos

ABSTRACT

Machado LFA. *Research on biomarkers as a prognostic factor in Ewing sarcoma family of tumors* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

INTRODUCTION: The Ewing sarcoma family of tumors (ESFT) comprises a spectrum of neoplasms of neuroectodermal cells of the bones and soft tissues with an aggressive biological behavior and poor outcome, characterized by translocations involving one of the genes of the TET/FET family and one of the genes of the ETS family, most commonly EWSR1 and FLI1. With the progress of personalized medicine, there is a great demand for biomarkers in ESFT that could have prognostic values and the potential for future targeted therapies. This study proposed the evaluation of protein expression of different classes of biomarkers, including proteins related to tumor suppression, cell proliferation, energy metabolism, immune activity, DNA repair pathways and stem cells.

METHODS: Immunohistochemical expression of the biomarkers MTAP, p16, STAG2, p53, USP22, PTEN, RKIP, Cyclin D1, MCTs (1, 2 and 4), CD147, CA IX, GLUT1, BRACHYURY, PD-L1, OCT4 and SALL4 was analyzed in a well-characterized series of 113 ESFT in a tissue microarray (TMA) platform. Expression profiles were then associated with patients' clinical-pathological parameters and overall survival for analysis of the prognostic impact.

RESULTS: p53 hyperexpression showed a statistically significant association with lower overall survival ($p < 0.001$), metastatic disease at diagnosis ($p = 0.017$) and age over 20 years ($p = 0.04$). Loss of MTAP ($p = 0.039$) and Brachyury ($p = 0.008$) were also significantly associated with lower overall survival. Regarding the clinical characteristics of the patients, metastatic disease at diagnosis and non-white ethnicity were associated with a worse prognosis.

CONCLUSIONS: The biomarkers p53, MTAP and Brachyury were identified as independent factors related to the prognosis. The use of these biomarkers as a prognostic factor in ESFT may aid in the risk stratification of patients and even stimulate the development of specific targeted drugs.

DESCRIPTORS: 1.Tumors 2.Ewing sarcoma 3.Primitive neuroectodermal tumors 4.Biomarkers 5. Immunohistochemistry 6.Prognosis

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os tumores da família do sarcoma de Ewing (TFSE) são neoplasias malignas dos ossos e partes moles, constituídas por células redondas e pequenas com graus variáveis de diferenciação neuroectodérmica, incluindo o sarcoma de Ewing dos ossos (SE), o sarcoma de Ewing extra-esquelético (SEE) e os denominados tumor neuroectodérmico primitivo (PNET) e tumor de Askin¹.

Por apresentarem características histológicas e imuno-histoquímicas semelhantes, além de alterações genéticas particulares, acredita-se que todos os tipos de TFSE sejam variações anátomo-clínicas da mesma entidade²⁻⁵, evitando-se atualmente os termos alternativos e sinônimos, especialmente “PNET”, que é empregado para um outro tipo de tumor do SNC e trato genital feminino^{1,6}. A terminologia destes tumores faz referência ao patologista norte-americano James Ewing (1866-1943) (Figura 1), que descreveu em 1921 um tumor ósseo agressivo de pequenas células sensível à radioterapia, acreditando tratar-se de um “endotelioma difuso do osso”^{7,8}. Estudos recentes sugerem que células-tronco mesenquimais ou derivadas da crista neural sejam as células de origem dos TFSE^{9,10}.



Figura 1- Dr. James Ewing (Fonte: <http://resource.nlm.nih.gov/101414704>)

O diagnóstico de TFSE clássico em um contexto clínico esperado e com características imuno-histoquímicas comuns, especialmente a expressão de CD99 e FLI1, não exige confirmação molecular (Figuras 2 e 3). No entanto, nos casos de variantes histológicas ou morfologia atípica (Figura 4), especialmente se associados à imuno-histoquímica inesperada, a confirmação genética para um diagnóstico convincente pode ser realizada por FISH (hibridização *in situ* por fluorescência) ou RT-PCR (reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa)¹¹. TFSE são geneticamente caracterizados por translocações recíprocas entre um gene membro da família TET/FET e um gene da família ETS, sendo que em aproximadamente 90% dos casos a translocação envolve EWSR1 e FLI1 [t(11, 22) (q24; q12)], gerando um fator de transcrição aberrante que pode ativar ou reprimir outros genes envolvidos na oncogênese^{1,5,11}.

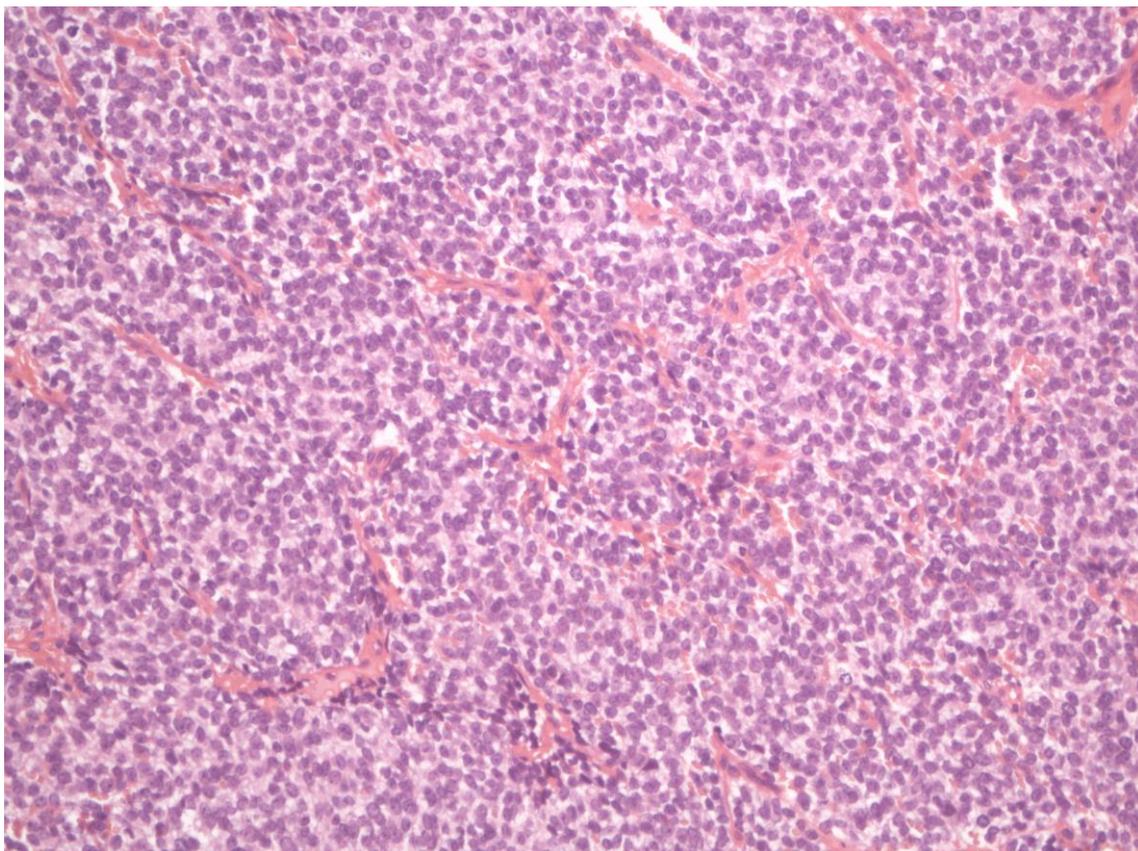


Figura 2 - Aspectos histológicos clássicos de um TFSE (Hematoxilina e Eosina, 200X). As células são pequenas e apresentam um padrão uniforme, com escasso citoplasma, núcleos redondos e nucléolos imperceptíveis

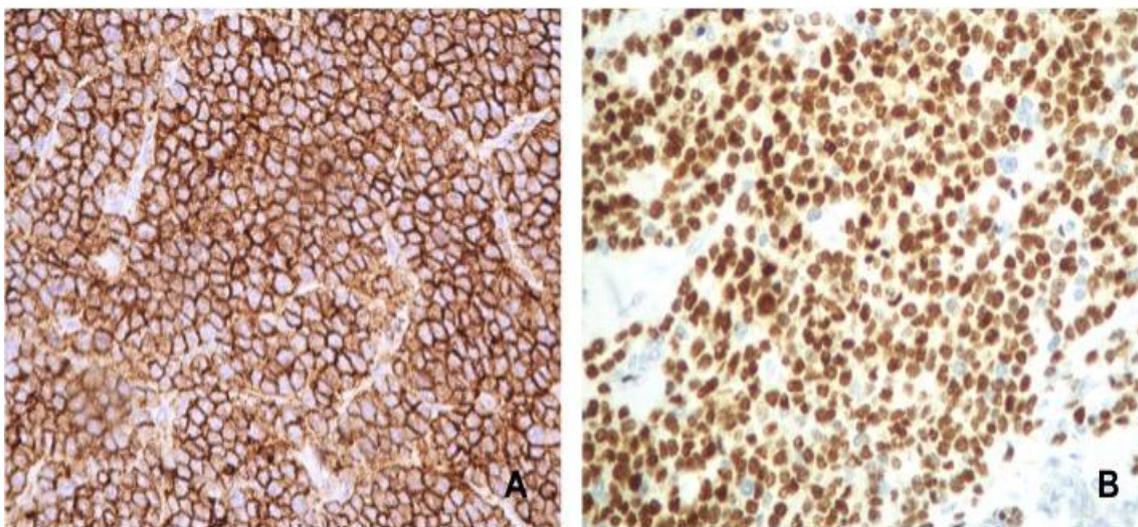


Figura 3 - Características imuno-histoquímicas dos TFSE (400X). A imunoexpressão de CD99 na membrana citoplasmática (A) e de FLI1 no núcleo (B) são características comuns dos TFSE que auxiliam no diagnóstico.

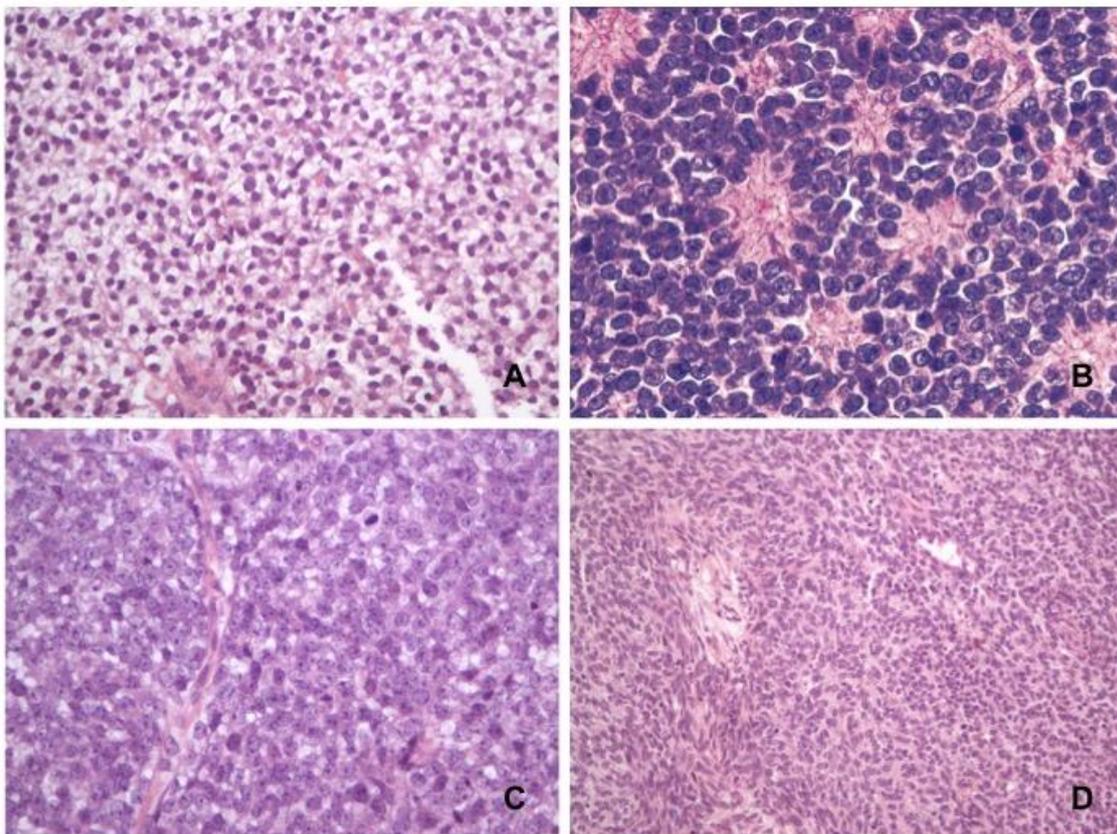


Figura 4 - Variações histológicas dos TFSE (Hematoxilina e Eosina).A - Padrão de células claras (200X); B - Com pseudo-rosetas (400X); C - Histologia atípica com nucléolos proeminentes (400X); D - Histologia atípica com células fusiformes (100X).

Os TFSE são mais frequentes em crianças e adolescentes e, embora ocorram também em adultos de todas as faixas etárias, cerca de 80% dos casos são diagnosticados em pacientes com idade abaixo de 20 anos^{1,8}. Embora os TFSE sejam sarcomas de alto grau e se apresentem com metástases no diagnóstico em 25% dos casos, observou-se nas últimas décadas um aumento significativo das taxas de sobrevivência, principalmente pela utilização de uma abordagem terapêutica multimodal que inclui quimioterapia, cirurgia e radioterapia^{12,13}. Para os casos de doença localizada, a taxa de sobrevida global de 5 anos atualmente fica entre 70% e 80% e para os casos de doença disseminada em cerca de 30%¹²⁻¹⁵.

Apesar dos avanços observados nas últimas décadas, ainda não há discriminação no tratamento para pacientes com doença localizada e para pacientes com doença avançada, desconsiderando-se as possíveis heterogeneidades existentes entre os indivíduos e a biologia dos tumores. Torna-se importante, portanto, identificar aqueles tumores que possam comportar-se de forma ainda mais agressiva, com metástases precoces, recidivas frequentes e aqueles que possam exigir intervenções terapêuticas diferentes.

O conhecimento mais amplo da biologia dos TFSE e da interação com cada paciente pode contribuir para o surgimento de novas modalidades terapêuticas personalizadas que visam alvos moleculares e, neste contexto, a imuno-histoquímica também tem papel relevante. O método imuno-histoquímico (IHQ) é uma técnica amplamente difundida e rotineiramente utilizada na maioria dos laboratórios de patologia. Grande parte das descobertas moleculares das doenças, especialmente das neoplasias, são validadas ou até mesmo originadas da avaliação da expressão proteica por IHQ.

Este estudo propõe a avaliação imuno-histoquímica da expressão de diferentes classes de marcadores, incluindo proteínas relacionadas à supressão tumoral, proliferação celular, metabolismo energético, atividade imune, vias de reparo do DNA e células tronco, a fim de identificar novos biomarcadores prognósticos e com potencial terapêutico para TFSE.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Neste trabalho buscamos esclarecer o perfil de expressão imuno-histoquímica de 18 biomarcadores [MTAP, p16, STAG2, p53, USP22, PTEN, RKIP, Ciclina D1, MCTs (1, 2 e 4), CD147, CA IX, GLUT1, BRACHYURY, PD-L1, OCT4 e SALL4] e seu impacto clínico em uma série bem caracterizada de TFSE, avaliando seus valores como fator prognóstico.

2.2 Objetivos secundários

- Caracterizar a casuística e determinar quais são as variáveis clínico-patológicas que se associam ao prognóstico;
- Verificar a associação dos achados da expressão imuno-histoquímica com os seguintes dados clínico-patológicos: sexo, idade no diagnóstico, etnia, tamanho do tumor, extensão da doença no diagnóstico (localizada ou metastática), localização tecidual (osso ou partes moles), característica topográfica (axial ou periférico) e grau de necrose (para os casos cirúrgicos);

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biomarcadores em câncer

De Gruttola *et al.* (2001), em um grupo de estudos da National Institutes of Health (NIH), definiram biomarcadores como características que podem ser medidas experimentalmente e indicar a ocorrência de uma determinada função normal ou patológica ou uma resposta a um agente farmacológico¹⁶. Segundo estes autores, os biomarcadores podem ser utilizados para estratificar doentes e identificar a gravidade ou progressão de uma determinada doença, prever um prognóstico ou monitorizar um determinado tratamento, evitando que alguns efeitos secundários ocorram¹⁶.

De acordo com Hodgson *et al.* (2009), um biomarcador útil é aquele que consegue passar as informações esperadas de uma maneira melhor, mais rápida ou mais barata do que as abordagens existentes, além de ser aplicável, ou seja, a tecnologia deve ser acessível¹⁷. Shukla *et al.* (2013) classificaram os biomarcadores utilizados em câncer como preditivos, quando proveem informação sobre a probabilidade de resposta à determinado tratamento, e prognósticos, quando proveem informação sobre os desfechos clínicos¹⁸.

Mordente *et al.* (2015) ponderam que, apesar dos avanços significativos em pesquisa de biologia do câncer e da utilização de novas tecnologias, a transferência de biomarcadores "candidatos" da teoria para a prática é um processo demorado e desafiador, sendo que relativamente poucos biomarcadores foram de fato adotados com sucesso na rotina clínica para pacientes oncológicos¹⁹. Os exemplos mais conhecidos de tais biomarcadores incluem receptor de estrógeno (RE) e/ou receptor de progesterona (RP) e

HER2 em câncer de mama²⁰, EGFR e ALK em câncer de pulmão²¹, C-KIT em tumor estromal gastrointestinal (GIST)²² e p16 em câncer de orofaringe²³.

A utilização de biomarcadores através da imuno-histoquímica tem permitido a avaliação do prognóstico, a individualização de alguns tratamentos e, conseqüentemente, o desenvolvimento da medicina personalizada em diversos tipos de câncer, embora em TFSE não estejam totalmente incorporados na prática clínica, como ponderam van Maldegem *et al.* (2012)²⁴.

3.2 Biomarcadores em TFSE

Em uma fase inicial dos estudos de biomarcadores em TFSE, aqueles relacionados ao ciclo celular parecem ter sido os mais explorados^{18,24-27}. Há duas décadas, Kovar *et al.* (1997) demonstraram perda de expressão de p16 em uma parcela de TFSE em um estudo considerado chave para posteriores investigações relacionadas ao impacto prognóstico deste biomarcador²⁵. Dez anos depois, Honoki *et al.* (2007), em uma meta-análise, reuniram evidências de que p16 era de fato um marcador negativo de prognóstico, sendo considerado um potencial candidato para melhorar a estratégia de estratificação de risco dos pacientes com TFSE²⁶.

Similarmente, De Alava *et al.* (2000) mostraram que outros biomarcadores do ciclo celular, mais especificamente Ki67 e p53, também se associaram a piores prognósticos em TFSE²⁷.

Com o passar dos anos, além dos bastante explorados marcadores de ciclo celular, outras classes de biomarcadores passaram a ser estudadas em

TFSE, tais como os relacionados à angiogênese, ao microambiente tumoral e à transição epitelial-mesenquimal^{18,24,28,29}.

Fuchs *et al.* (2004) observaram expressão imuno-histoquímica positiva de VEGF, um dos principais marcadores de angiogênese, em 55% dos casos de uma série de 31 TFSE e concluíram que este biomarcador foi um preditor negativo independente de sobrevivência²⁸.

CCN3, uma proteína com função de produção de matriz extracelular e envolvida em vários processos biológicos tais como adesão, migração e proliferação, foi estudada por IHQ em uma série de 170 TFSE por Perbal *et al.* (2009). Seus resultados mostraram que a expressão de CCN3 em TFSE estava associada a um pior prognóstico²⁹.

Recentemente, Cash *et al.* (2017) avaliaram a expressão de Ezrin (uma proteína com papel importante na adesão, migração e organização da estrutura da superfície celular) por IHQ em 53 TFSE. Observou-se expressão de Ezrin em 72% dos casos e sua expressão intensa se associou com melhor prognóstico nestes pacientes³⁰.

Apesar da variedade de estudos na literatura e do número considerável de biomarcadores promissores, muitos pesquisadores utilizaram coortes pequenas de pacientes^{18,24}. Ademais, há um grande número de biomarcadores que, embora tenham demonstrado relevância prognóstica em outros tipos de neoplasias, ainda não foram estudados em TFSE³¹⁻³⁹. Além da importância para avaliação de prognóstico e risco, estes novos biomarcadores podem ser a chave para futuras terapias-alvo específicas.

3.2.1 MTAP

Metiltioadenosina fosforilase (MTAP) é uma proteína produto do gene supressor tumoral MTAP, localizado na região 9p21, próximo ao gene p16 (CDKN2A), que desempenha um papel importante no metabolismo das purinas e poliaminas⁴⁰ (Figura 5). A deficiência desta enzima foi encontrada em diferentes tipos de neoplasia e têm sido associada à maior agressividade tumoral³⁸⁻⁴¹. Su *et al.* (2014), em um estudo de IHQ que incluiu 99 amostras de câncer de pulmão, demonstraram que MTAP é um marcador independente de prognóstico em pacientes com câncer de pulmão do tipo "não-pequenas células"³⁸. No estudo de Becker *et al.* (2015), os autores sugerem que a perda da expressão de MTAP pode estar associada também a um aumento da malignidade dos gliomas cerebrais⁴¹. Similarmente, De Oliveira *et al.* (2016) em um estudo de câncer de mama, observaram que a perda de expressão de MTAP se associou à subtipos de tumores mais agressivos³⁹. Uma das possíveis explicações para a associação com agressividade tumoral é que nas células neoplásicas a inativação de MTAP estimula a síntese *de novo* de purinas, o que está relacionado à maior proliferação celular⁴¹. Em contrapartida, células neoplásicas MTAP-deficientes são mais sensíveis a agentes inibidores da síntese de purinas, como metotrexate (MTX), azathioprine (AZA) e 5'- fluorouracil (5'-FU), o que aponta MTAP como um alvo terapêutico promissor³⁹⁻⁴². Não há na literatura, até a presente data, publicações de estudos sobre a expressão IHQ de MTAP em TFSE.

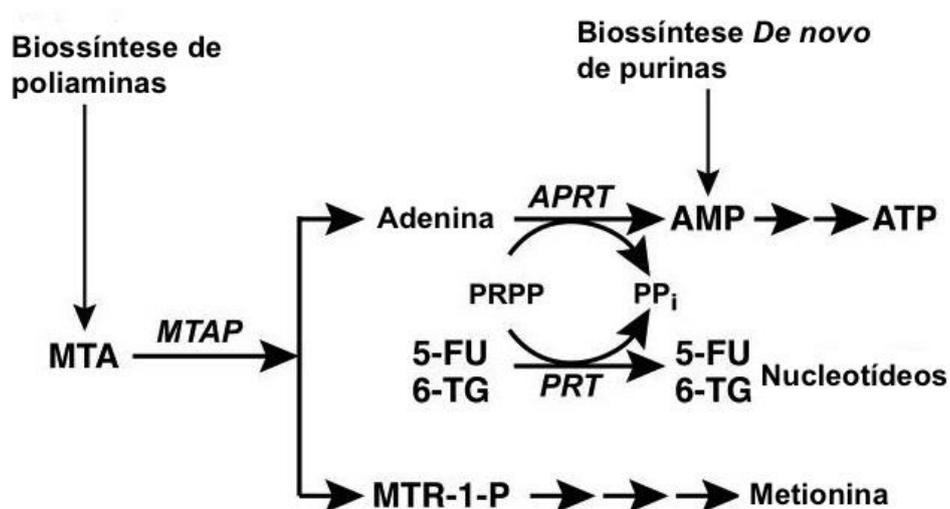


Figura 5 - Via metabólica do MTAP. Em células normais, o MTAP cliva MTA, um subproduto da biossíntese de poliaminas, em adenina e MTR-1-P. Em células deficientes em MTAP, contudo, o MTA não é clivado e a via de salvação para adenina e metionina está ausente, havendo um estímulo à síntese *de novo* de purinas⁴²

3.2.2 p16

Também conhecido como CDKN2, p16 é um gene que inibe proteínas quinases dependentes de ciclina D1, desempenhando uma função importante na regulação do ciclo celular e, por conseguinte, atuando como um supressor tumoral⁴³ (Figura 6). As freqüentes mutações e deleções de p16, geralmente junto com a deleção de MTAP, sugerem um papel importante de p16 na carcinogênese em diversos tumores^{38,43}. Knosel *et al.* (2014) estudaram a expressão imuno-histoquímica de p16 em 183 sarcomas de partes moles e observaram que a perda de expressão de p16 estava associada aos sarcomas de alto grau e à redução de sobrevida dos pacientes³⁵. Em TFSE, p16 tem sido considerado um preditor estatisticamente significativo de prognóstico em estudos retrospectivos, como mostraram Honoki *et al.* (2007) em uma meta-análise que avaliou 6 estudos, representando 188 pacientes²⁶. Mais

recentemente, entretanto, o estudo prospectivo de Lerman *et al.* (2015) com 112 pacientes, mostrou que a deleção de p16 não foi um biomarcador prognóstico confiável em SE localizado⁴⁴.

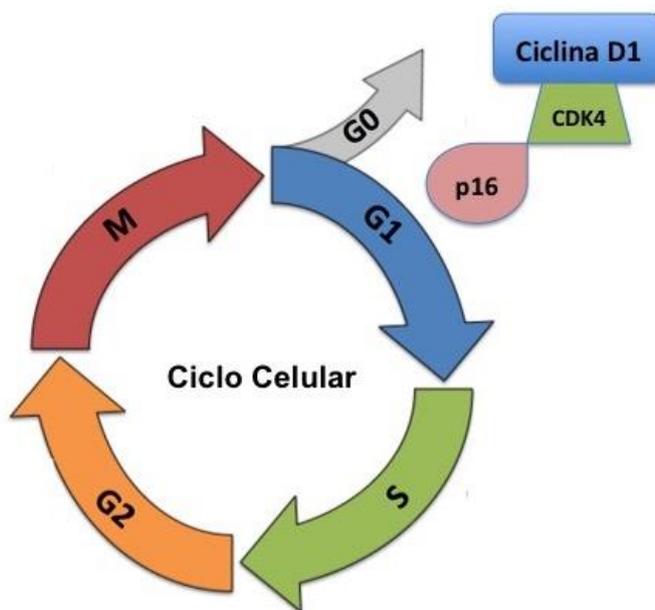


Figura 6 - Relação de Ciclina D1 e p16 no ciclo celular. A proteína Ciclina D1 forma um complexo com a enzima CDK4 e funciona como sua subunidade reguladora, cuja atividade é necessária para a transição G1 / S do ciclo celular. A proteína p16 inibe enzimas dependentes de ciclinas, como a CDK4, bloqueando a progressão desta fase do ciclo celular

3.2.3 Ciclina D1

É um oncogene que regula a progressão da fase G1 do ciclo celular para a fase S, desempenhando uma função fundamental no processo de carcinogênese e progressão de câncer em diversos tipos de neoplasias^{31,45} (Figura 6). Embora Fuchs *et al.* (2004) tenham mostrado que a expressão de ciclina D1 não se correlacionou com sobrevida em 31 pacientes estudados com TFSE²⁸, o estudo mais recente de Fagone *et al.* (2015) demonstrou que a proteína está frequentemente hiperexpressa em TFSE, sugerindo a

possibilidade de utilização de drogas dirigidas à ciclina D1 como potenciais estratégias terapêuticas⁴⁶.

3.2.4 PTEN

PTEN, abreviação em inglês de “*Phosphatase and Tensin Homologue*”, é uma fosfatase lipoproteica codificada pelo gene supressor tumoral PTEN, localizado no cromossomo 10q23⁴⁷. Segundo Li *et al.* (2007), a função de PTEN como supressor tumoral é um contínuo que está relacionado com o nível de expressão ou atividade de sua proteína e sua perda leva à desregulação de várias vias importantes para a transformação celular, especialmente a via PI3K-Akt⁴⁸. Song *et al.* (2012) mostraram que esta via têm efeito na transcrição, proliferação, sobrevivência celular, invasividade e angiogênese⁴⁷ (Figura 7). A perda de expressão da proteína PTEN tem sido estudada em diversos tumores, sendo geralmente associada a prognósticos desfavoráveis⁴⁹⁻⁵³. Niemeyer *et al.* (2015) analisaram a expressão de PTEN em linhas celulares de TFSE, concluindo que PTEN é um modificador de fenótipos oncogênicos nestes tumores, sugerindo potenciais implicações clínicas⁵¹.

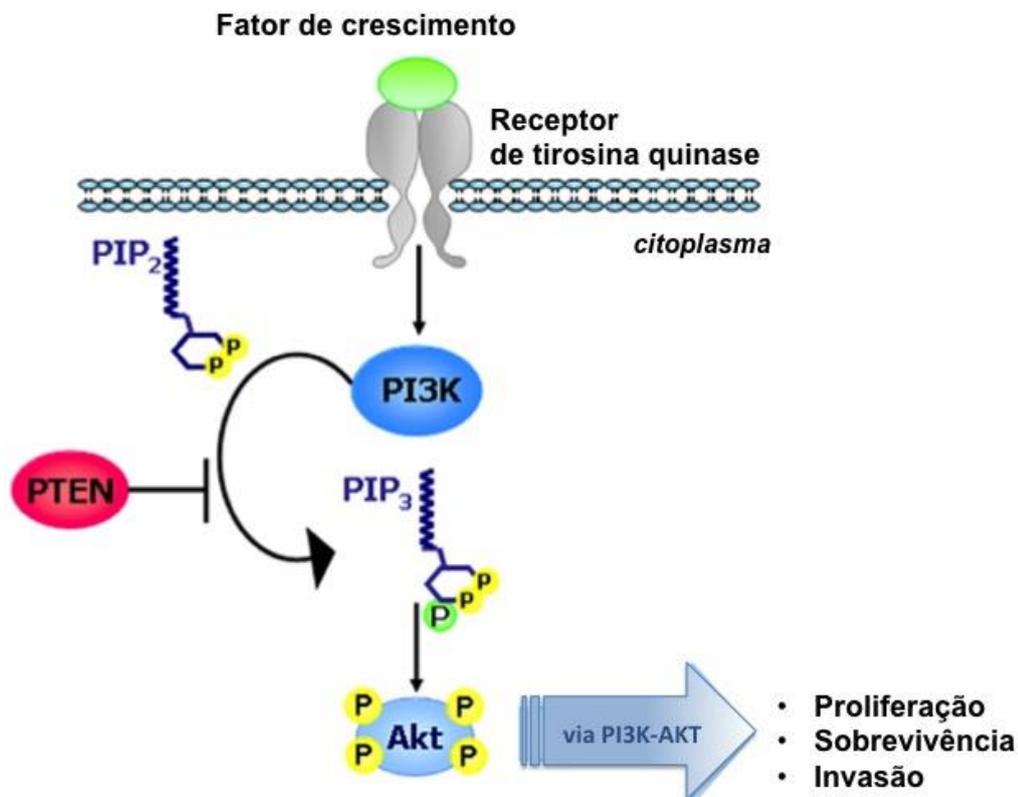


Figura 7 - Via PI3K-PTEN-Akt. A função principal de PTEN é a regulação de PI3K/Akt/mTOR. Em resposta à estímulos extracelulares (por exemplo, fatores de crescimento) PI3K é ativado por receptores de tirosina quinase ou receptores acoplados a proteína G, fosforilando PIP₂ para gerar PIP₃, que por sua vez fosforila e ativa Akt. PTEN antagoniza a ação de PI3K desfosforilando PIP₃ para gerar PIP₂, bloqueando assim, a cascata de sinalização PI3K⁴⁷

3.2.5 p53

Este gene desempenha um papel central na defesa celular contra estímulos oncogênicos, através da sua capacidade de dirigir a expressão de genes alvo para evocar respostas celulares, tais como o bloqueio do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA e senescência^{54,55} (Figura 8). Segundo Vousden *et al.* (2009), considerando-se somente mutações somáticas, p53 é o gene mais frequentemente alterado em câncer, sendo suas mutações somáticas encontradas em até 50% de todos os tipos de neoplasias⁵⁵. No entanto, em TFSE mutações de p53 são incomuns e seu impacto prognóstico

ainda não foi extensivamente estudado^{27,54,56}. De Alava *et al.* (2000), em um estudo retrospectivo de 55 TFSE, mostraram que os casos com expressão alterada de p53 tiveram associação significativa com menor sobrevida global²⁷. Em um estudo mais amplo com 299 pacientes, Tirode *et al.* (2014) mostraram que as mutações de p53 em TFSE geralmente ocorrem em conjunto com mutações de STAG2, aumentando a instabilidade genética em subtipos particularmente agressivos de TFSE⁵⁶. A análise da expressão alterada de p53 por IHQ pode auxiliar na definição de um subgrupo clínico de pacientes com piores prognósticos, além de identificar os tumores sensíveis a abordagens terapêuticas específicas direcionadas à ativação de p53^{27,54}.

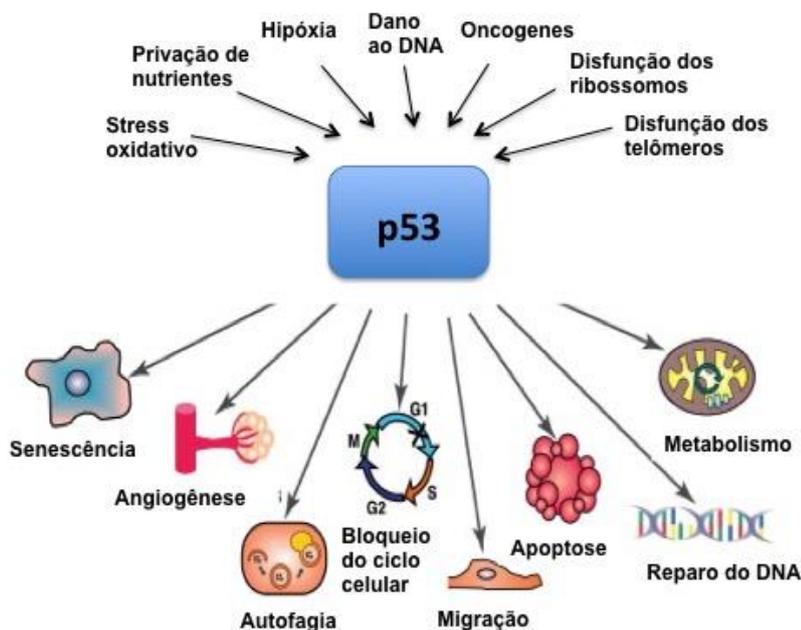


Figura 8 - As múltiplas respostas de p53. A ativação de p53 em resposta à sinais de estresse celular desencadeia diversos efeitos de caráter supressor tumoral, como indução de apoptose, bloqueio do ciclo celular e senescência. Sua inativação por mutações somáticas ocorre em cerca de 50% dos cânceres humanos⁵⁵

3.2.6 STAG2

STAG2 é um gene que codifica uma subunidade da coesina, uma proteína estrutural envolvida na organização cromossômica com função de criar "coesão" entre cromátides irmãs após a replicação do DNA⁵⁷ (Figura 9). Alterações em STAG2 podem interromper a segregação cromossômica durante a mitose, levando à acumulação de mutações estruturais e aneuploidia, como mostraram Solomon *et al.* (2011)⁵⁸. As mutações de STAG2 já foram observadas em diferentes tipos de tumores, incluindo melanoma⁵⁹, tumores de pâncreas³³ e, recentemente, TFSE^{56,57}. Embora os TFSE tenham uma taxa mutacional muito baixa, o gene mais frequentemente mutado em TFSE é justamente o STAG2, de acordo com as duas pesquisas mais amplas em genômica dos TFSE, os estudos de Brohl *et al.* (2014) e Tirode *et al.* (2014)^{56,57}. Interessantemente, segundo Tirode *et al.* (2014), o significado prognóstico da mutação STAG2 em TFSE parece ser fortemente dependente da co-existência de uma mutação no gene p53⁵⁶. Até a data, este estudo é o segundo a analisar a expressão proteica de STAG2 por IHQ em TFSE.

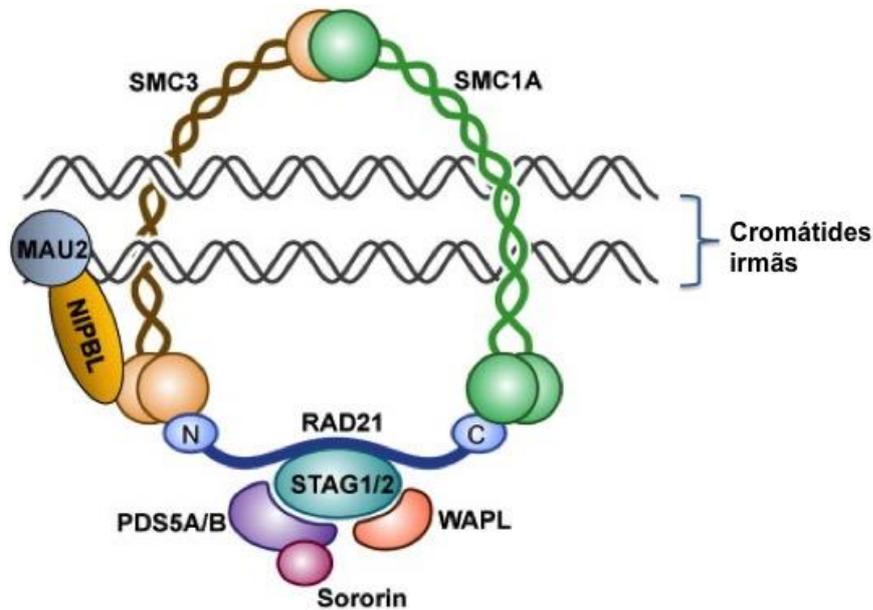


Figura 9 - Modelo do complexo de coesina. STAG2 é uma das subunidades da coesina, um complexo proteico que regula a separação de cromátides irmãos durante a divisão celular. A inativação deste gene e produção deficiente da proteína resultam em defeitos de coesão das cromátides e aneuploidia⁵⁷

3.2.7 USP22

A protease ubiquitina-específica 22 (USP22) foi recentemente reconhecida como uma enzima que remove fragmentos de ubiquitina de histonas H2A e H2B e regula acetilação das histonas do complexo SAGA (Figura 10), importante para o reparo do DNA, como mostraram Zhang *et al.* (2008)⁶⁰. Além de também estar associada com a progressão do ciclo celular, USP22 é considerada um marcador de células-tronco^{60,61}. Sussman *et al.* (2013) também mostraram que USP22 é um importante modificador epigenético que controla a transição entre auto-renovação celular e diferenciação das células-tronco embrionárias, sendo necessária para a diferenciação nos três folhetos embrionários⁶². De acordo com Schrecengost *et al.* (2014), como tem um papel importante na progressão tumoral e promove fenótipos agressivos aos tumores, esta enzima parece ser um alvo terapêutico

atraente para tratar doença avançada⁶³. Na literatura, observam-se estudos com a expressão de USP22 em câncer de pulmão⁶⁴, esôfago³⁶, glândula salivar³², fígado⁶⁵ e tireóide⁶⁶, no entanto, ainda não há até a data, estudos em TFSE publicados.

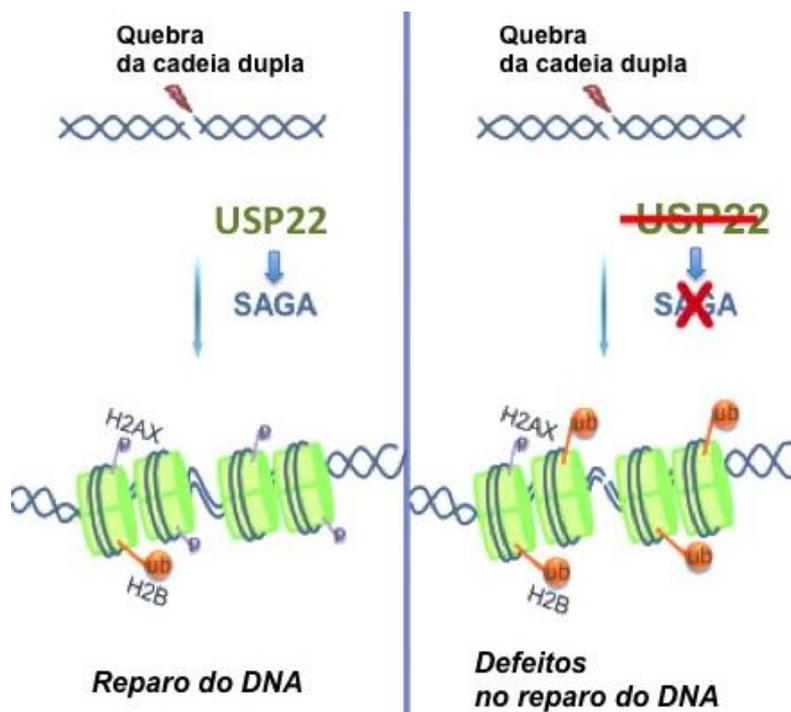


Figura 10 - O papel de USP22 no complexo SAGA. A deficiência na atividade de USP22 e ausência de remoção de ubiquitina prejudica o reparo de rupturas da cadeia dupla do DNA, o que pode levar à instabilidade genômica⁶⁰

3.2.8 OCT4

OCT4 (fator de transcrição octâmero de ligação 4) é uma proteína codificada pelo gene POU5F1 e, assim como USP22, é relacionado à pluripotência e regulação da auto-renovação e diferenciação de células-tronco embrionárias, incluindo células germinativas^{67,68} (Figura 11). Foi descrito como fator de mau prognóstico para alguns tipos de neoplasia, incluindo câncer de esôfago³⁴, ovário⁶⁷ e pulmão⁶⁹. Liu *et al.* (2013) indicaram que OCT4 também é

um biomarcador promissor para aplicações clínicas, pois reduzindo sua expressão ou bloqueando suas vias, poderia haver suspensão do crescimento tumoral⁷⁰. No entanto, a identificação de células-tronco em TFSE foi muito pouco explorada⁷¹ e este parece ser o primeiro estudo a analisar a expressão IHQ de OCT4 nestes tumores.

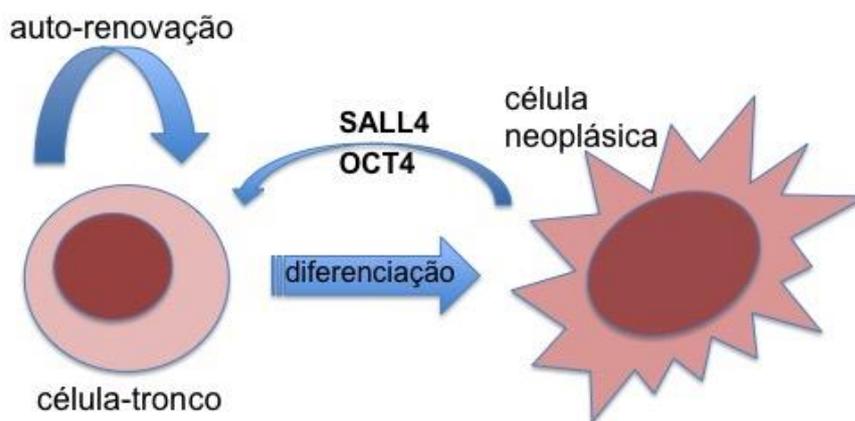


Figura 11 - OCT4, SALL4 e células-tronco. Ambas proteínas OCT4 e SALL4 têm papel importante na regulação da auto-renovação das células-tronco embrionárias e diferenciação, mantendo sua capacidade de pluripotência e podendo ter efeito em alguns tipos de neoplasia

3.2.9 SALL4

A proteína SALL4 é um fator de transcrição codificado por um membro da família de genes Spalt-like (SALL), com um papel essencial na pluripotência das células-tronco e que, assim como OCT4, mantém as propriedades de auto-renovação das células-tronco embrionárias⁷² (Figura 11). Segundo Dirican *et al.* (2016), SALL4 pode ser considerado como um regulador para o controle do crescimento celular, proliferação e apoptose⁷³. Na literatura, sua associação com prognóstico desfavorável foi demonstrada em estudos recentes de câncer de mama⁷³, hepatoblastomas⁷⁴, câncer de esôfago⁷⁵ e uma meta-análise de

Cheng *et al.* (2016) que analisou outros 22 estudos de tumores sólidos, cujos resultados promovem SALL4 a um status de candidato atrativo para novas terapias-alvo⁷⁶. No entanto, em TFSE, até a presente data, este biomarcador ainda não havia sido estudado.

3.2.10 RKIP

A proteína inibitória da quinase Raf (RKIP) é uma proteína multifuncional em carcinogênese, sendo implicada em diversas vias de sinalização intracelulares como RAF/MEK/ERK e NF-κB, controlando o crescimento celular, a motilidade, a transição epitelial-mesenquimal, a diferenciação tumoral, capacidade de invasão e metástases à distância^{77,78} (Figura 12). A perda de sua expressão tem sido estudada em tipos variados de câncer, incluindo gliomas⁷⁷, sarcomas de partes moles⁷⁸ e outros tumores sólidos⁷⁹, embora não se observem publicações relacionados a TFSE até a presente data na literatura. Em sua meta-análise que incluiu 56 publicações, Lamiman *et al.* (2014) observaram que a maioria dos estudos revelaram que a perda de expressão de RKIP se associou com menores sobrevidas global e livre de doença e com presença de metástase na maioria dos tumores sólidos, podendo ser utilizado como um biomarcador relacionado a mau prognóstico⁷⁹.

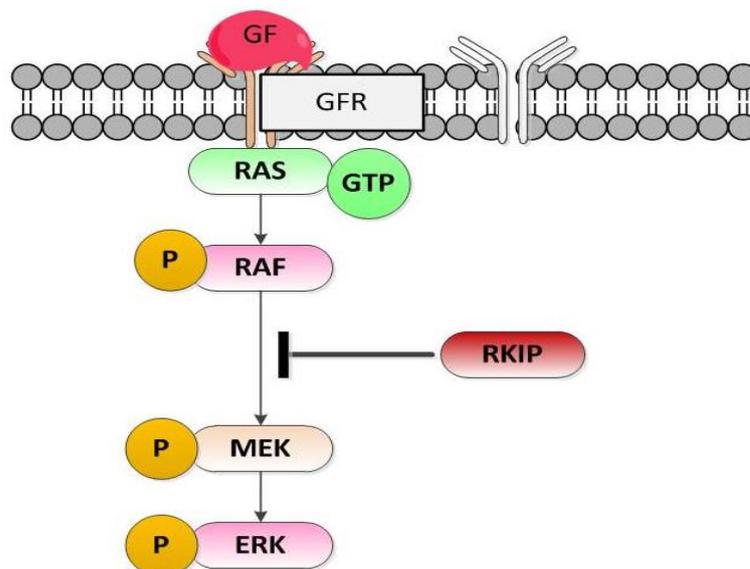


Figura 12 - A cascata de sinalização intracelular Ras/Raf/MEK/ERK. Esta é uma via importante no controle do crescimento, diferenciação e sobrevivência das células, podendo ser ativada por uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo fatores de crescimento (GF). RKIP liga-se a Raf ou MEK e assim interfere na ativação de MEK, sendo portanto um regulador negativo desta via de sinalização⁷⁷

3.2.11 *Brachyury*

Brachyury é um fator de transcrição codificado por um gene do grupo dos genes T-Box, tipicamente expresso na notocorda e em cordomas⁸⁰ (Figura 13). Esta proteína foi identificada como uma condutora no processo de transição epitelial-mesenquimal (EMT), levando a um fenótipo de câncer mais invasivo, como descreveram Fernando *et al.* (2010)⁸¹. De acordo com as publicações na literatura, a expressão de Brachyury está frequentemente associada a tumores agressivos e pior prognóstico, como foi observado em câncer de pulmão⁸², mama⁸³, próstata⁸⁴ e GISTs⁸⁵. Entretanto, não há ainda publicações de estudos da expressão de Brachyury e sua correlação com desfechos clínicos em pacientes com TFSE.

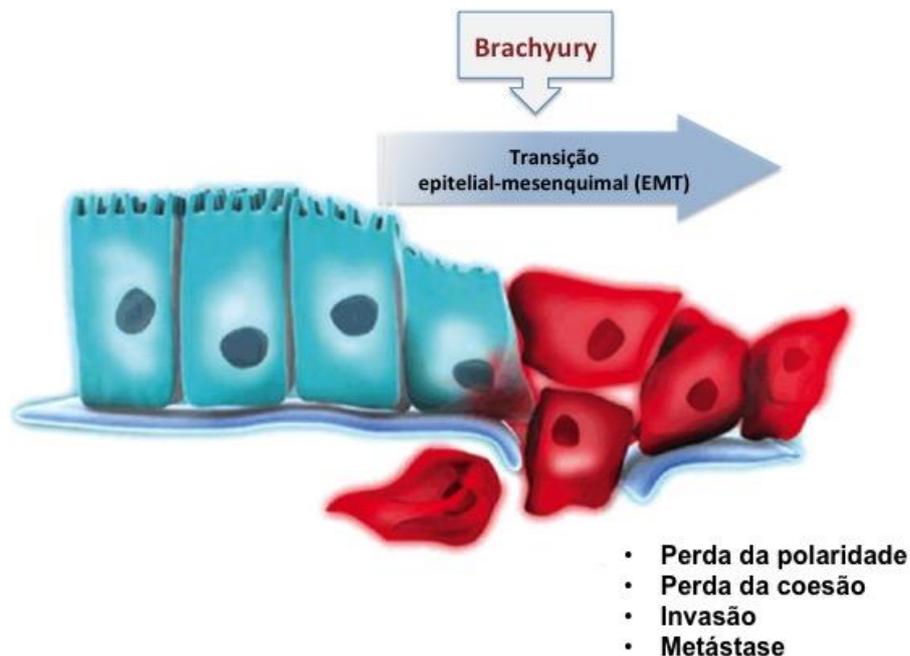


Figura 13 - Brachyury e transição epitelial-mesenquimal (EMT). O fator de transcrição Brachyury pode conferir às células tumorais características de células mesenquimais, incluindo maior motilidade e capacidade de invasão, interferindo na progressão e metástase em diversos tipos de neoplasia

3.2.12 MCTs e CD147

Os transportadores de monocarboxilatos (MCTs) são proteínas transmembranárias que desempenham um importante papel na extrusão de lactato das células, contribuindo para a manutenção do pH intracelular^{37,86} (Figura 14). São codificados por 14 membros da família de genes SLC16A, no entanto somente os quatro primeiros, MCT1-4, são capazes de transportar lactato e outros monocarboxilatos pela membrana celular⁸⁷. As alterações no microambiente tumoral vêm, recentemente, emergindo como componentes-chave na carcinogênese, especialmente através da reprogramação do metabolismo energético pelo fenômeno de Warburg, isto é, a preferência das células tumorais pelo fenótipo glicolítico mesmo na presença de oxigênio, como explicam Hanahan *et al.* (2011)⁸⁸. De acordo com Pinheiro *et al.* (2012), como

os tumores sólidos exibem um fenótipo hiperglicolítico, com quantidades elevadas de lactato no interior das células, é provável que seja observado um aumento da expressão dos transportadores de lactato nestes tumores⁸⁶. Embora haja na literatura informações sobre a expressão e significado clínico-patológico dos MCTs em alguns tipos de neoplasias^{86,89,90}, as publicações são excepcionais em sarcomas, como o estudo de Pinheiro *et al.* (2014), que mostrou uma associação entre a expressão de MCT1 e pior prognóstico em uma série de 86 sarcomas de partes moles³⁷.

O CD147, é uma chaperona de MCT1 e MCT4, ou seja, é uma proteína que têm como papel auxiliar estas outras proteínas em suas funções, além de ter uma função paralela de indutor de metaloproteinase de matriz, como informam Gabison *et al.* (2005)⁹¹ (Figura 14). A expressão de CD147 está correlacionada com pior prognóstico em alguns tipos de câncer e isto parece estar associado à esta sua função de chaperona de MCTs, contribuindo para o fenótipo hiperglicolítico e ácido-resistente dos tumores, como mostra o estudo de meta-análise de Bovenzi *et al.* (2015) que incluiu 25 publicações^{37,89,92}. No entanto, ainda não há na literatura publicações de estudos de MCTs e CD147 em TFSE.

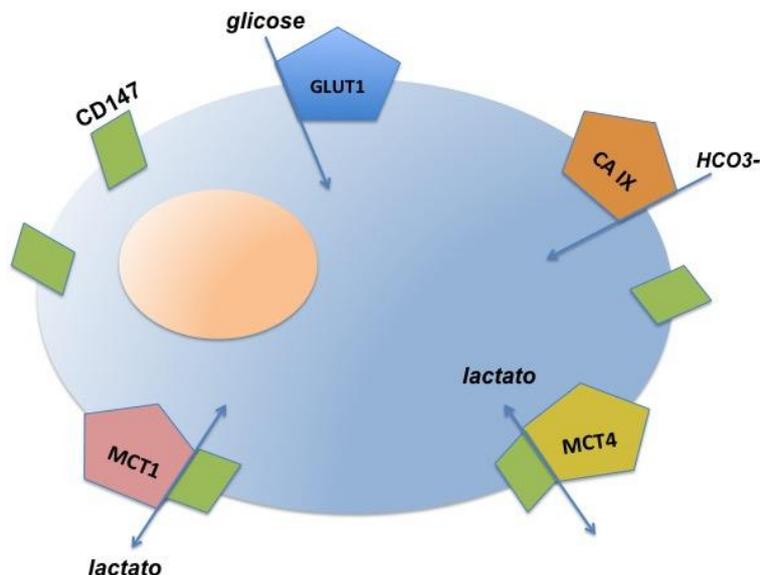


Figura 14 - Transportadores de monocarboxilatos (MCTs) e marcadores de hipóxia no metabolismo energético tumoral. Os MCTs têm papel importante na manutenção do pH intracelular, retirando os produtos metabólicos ácidos das células, auxiliados pela chaperona CD147. GLUT1 tem a função de facilitar o transporte de glicose para as células tumorais que demandam energia e exigem um perfil hiperglicolítico. CA IX promove a entrada de bicarbonato, contribuindo para a regulação do pH em um ambiente de hipóxia e acidose.

3.2.13 GLUT1 e CAIX

O transportador de glicose 1 (GLUT1) é uma proteína codificada pelo gene SLC2A1, com função de facilitar o transporte de glicose através da membrana citoplasmática das células⁹³. A anidrase carbônica IX (CAIX) é uma enzima codificada pelo gene CAIX, com a função de facilitar o transporte de bicarbonato para as células, com o objetivo da alcalinização intracelular e regulação do pH em um ambiente de hipóxia e acidose⁹⁴ (Figura 14). Pinheiro *et al.* (2011) explicam que GLUT1 e CAIX são regulados pelo factor-1 indutível por hipóxia (HIF-1) e, portanto, ambos têm papéis importantes nas adaptações do microambiente tumoral, sendo reconhecidos como biomarcadores de hipóxia⁹⁵. A expressão de GLUT1 (fenótipo glicolítico) e a expressão de CAIX (fenótipo resistente a ácido) podem resultar em uma poderosa vantagem

adaptativa das células tumorais e representar um fenótipo agressivo⁹⁶. Segundo Sediakova *et al.* (2014), geralmente os tumores agressivos apresentam maior expressão de GLUT1, visto que suas células têm uma maior demanda de energia metabólica com utilização da glicose e, conseqüentemente, um excesso de produtos metabólicos ácidos, conferindo também maior expressão de CAIX⁹⁴. As publicações na literatura mostram que o nível de expressão de GLUT1 e CAIX correlaciona-se com o prognóstico de pacientes com alguns tipos de câncer, tais como carcinomas de mama^{95,96}, bexiga⁹⁷ e ovário⁹⁸. Estes biomarcadores de hipóxia, no entanto, ainda não haviam sido explorados em TFSE.

3.2.14 PD-L1

PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) é uma proteína codificada pelo gene CD274 que, ao se ligar ao receptor PD-1, desempenha um papel importante na supressão do sistema imunitário, através da transmissão de um sinal inibitório que reduz a proliferação de células T⁹⁹ (Figura 15). Segundo Pardolli *et al.* (2012), as células tumorais podem regular positivamente o eixo PD1/PD-L1 como forma de diminuir a resposta imune do hospedeiro e, portanto, tentar evitar sua destruição¹⁰⁰. Com o atual "boom" de pesquisas relacionadas à imunoterapia em câncer, observa-se um crescente número de publicações referentes a PD-L1, sendo que as mais recentes têm mostrado expressão aumentada deste marcador em diversos tipos de câncer, como no câncer colorretal¹⁰¹, GISTs¹⁰², tumores pancreáticos¹⁰³, câncer do colo uterino¹⁰⁴ e osteossarcoma¹⁰⁵. O uso de anticorpos monoclonais

imunomoduladores que bloqueiam estes "check-points" imunológicos já é uma realidade no tratamento de alguns tipos de câncer^{99,106,107} e considerada por alguns pesquisadores, como Tsukahara *et al.* (2016) e Nowicki *et al.* (2016) uma estratégia terapêutica promissora também para sarcomas^{108,109}. Entretanto, não há ainda na literatura estudos sobre a expressão de PD-L1 e sua associação com prognóstico em pacientes com TFSE.

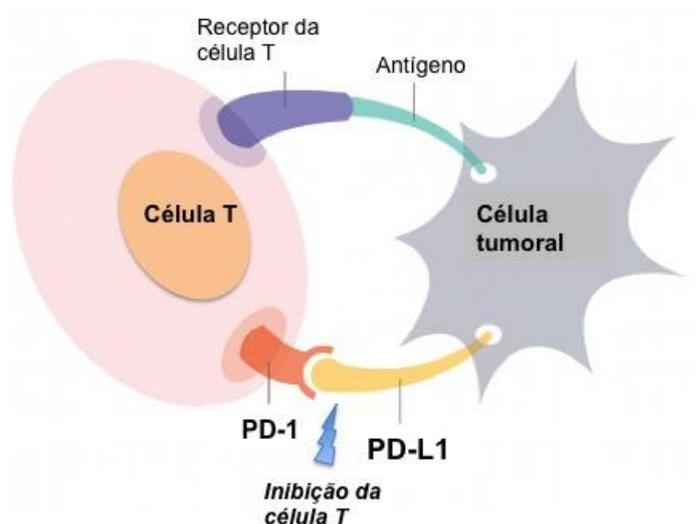


Figura 15 - O eixo PD1/PD-L1. As células tumorais podem ativar o eixo PD1/PD-L1, inibindo a resposta imune mediada por linfócitos T como meio de defesa⁹⁹

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras tumorais

Neste estudo foram utilizadas amostras tumorais de pacientes com diagnóstico de TFSE, no período compreendido entre os anos de 2001 e 2014 e com seguimento até 31/08/2016, já tratados ou sob tratamento no Hospital de Câncer de Barretos, SP (HCB). O levantamento preliminar de casos foi realizado pelo sistema operacional *SisOnco*, que armazena a base de dados da Patologia do HCB, e somente os casos que continham informações clínicas disponíveis e amostras tumorais em blocos de parafina com material suficiente para a confecção de *tissue microarrays* (TMA) e disponíveis no arquivo de blocos do Departamento de Anatomia Patológica foram incluídos no estudo.

As lâminas de Hematoxilina e Eosina (H&E) de todos os casos foram reavaliadas de forma independente por dois patologistas com *expertise* em tumores de osso e partes moles, assim como os estudos imuno-histoquímicos prévios e seus respectivos laudos anátomo-patológicos. Os casos incluídos, além de terem material suficiente, deveriam ter seu diagnóstico de TFSE confirmado pelos patologistas que, em caso de discordância, utilizaram-se dos seguintes critérios patológicos para alcançarem consenso: morfologia clássica com expressão imuno-histoquímica de CD99 na membrana citoplasmática e/ou FLI1 no núcleo das células tumorais; morfologia não clássica com imunexpressão de CD99 e FLI1 (ou NKX2.2) associada à ausência de imunexpressão de marcadores de outros tumores de pequenas células ou presença de translocação de EWSR1 após realização de FISH.

Pelo sistema operacional *SisOnco*, 119 casos foram previamente levantados, sendo que 113 foram incluídos no estudo. Dos casos excluídos, 4 não continham material suficiente para confecção de TMA, 1 teve seu bloco de parafina retirado do arquivo pela família do paciente e 1 não preencheu os critérios para diagnóstico de TFSE, sendo reavaliado como tumor desmoplásico de pequenas células.

4.2 TMAs

Havendo concordância quanto ao diagnóstico e material suficiente, as áreas tumorais dos respectivos blocos de parafina foram marcadas para posterior extração. O passo seguinte foi a confecção dos TMAs.

Neste trabalho, optou-se pela construção de TMA pois esta técnica permite reunir um grande número de casos em um único bloco de parafina, tornando as análises morfológica e imuno-histoquímica maximizadas e os custos das reações diminuídos. Diversos estudos avaliaram a significância estatística dos TMAs, aprovando sua utilização para pesquisas em larga escala amostral^{110,111}.

Os TMAs foram montados com auxílio do equipamento *Manual Tissue Arrayer* MTA-1 (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, EUA). Este equipamento cria orifícios em um bloco de parafina receptor que então recebe as amostras teciduais retiradas com uma agulha de calibre 1.0 mm.

Foram confeccionados dois blocos de TMA, sendo que cada um deles continha um cilindro de 1.0 mm de cada tumor selecionado. Desta forma, todos os tumores foram amostrados em duplicatas com o intuito de evitar possíveis

perdas por desgaste do bloco ou descolamento do cilindro. Amostras de tecidos não tumorais também foram acrescentados nos blocos de TMA para utilização como controles negativos e positivos. Os TMAs foram cortados no micrótomo na espessura de 4.0 μ e seus cortes posteriormente submetidos à coloração de hematoxilina e eosina para conferência histológica e às reações imuno-histoquímicas com os biomarcadores.

4.3 Estudo Imuno-histoquímico

Para o estudo imuno-histoquímico foram utilizadas lâminas com carga positiva Starfrost® (Kinttel, Braunschweig, Alemanha). As lâminas com as amostras teciduais foram submetidos à desparafinização e hidratação por meio de banhos sequenciais de xilol e álcool etílico. A maioria das reações foram realizadas por equipamentos automatizados, de acordo com as especificações pré-estabelecidas pelos fabricantes dos anticorpos, embora para alguns tenha sido utilizado processo manual, de acordo com informações fornecidas pelos fabricantes ou padronizações previamente obtidas no laboratório. As reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado. Os processos automatizados e manuais utilizados para os anticorpos e suas respectivas especificações estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos anticorpos e metodologias

Anticorpo	Metodologia	Especificações
p53	Plataforma automatizada: Autostainer Link 48, Dako	Anti-Human p53 Protein, Clone DO-7, mouse monoclonal, Dako (kit pronto)
Ciclina D1	Plataforma automatizada: Autostainer Link 48, Dako	Anti-Human Cyclin D1, Clone EP12, rabbit monoclonal, Dako (kit pronto)
p16	Plataforma automatizada: Ventana Benchmark Ultra, Roche	p16 INK4a, Clone E6H4, CINTec®, mouse monoclonal, Roche (kit pronto)
MTAP	Processo manual: Recuperação com tampão misto (citrato 0.01M/EDTA 1 mM, pH=6), 125°C, 4 min e 90°C, 20 min, incubação: overnight	MTAP antibody, rabbit polyclonal, Proteintech Group, Inc. (diluição: 1:300)
STAG2	Plataforma automatizada: Ventana Benchmark Ultra, Roche	Anti-SA2 antibody, clone ab155081, rabbit monoclonal, Abcam (diluição 1:100)
USP22	Plataforma automatizada: Ventana Benchmark Ultra, Roche	Anti-USP22 antibody, clone ab4812, rabbit polyclonal, Abcam (diluição 1:400)
PTEN	Plataforma automatizada: Autostainer Link 48, Dako	Anti-Human PTEN Concentrate, Clone 6H2.1, mouse monoclonal, Dako (diluição 1:100)
RKIP	Processo manual: Recuperação com tampão de citrato (0.01 M, pH=6), 98°C, 20 min, incubação: 1H	Anti-RKIP antibody (07-137), rabbit polyclonal, Upstate Biotechnology (diluição: 1:600)
Brachyury	Plataforma automatizada: Autostainer Link 48, Dako	Brachyury, rabbit polyclonal, sc-20109, Santa Cruz Biotechnology (diluição: 1:400)
PD-L1	Plataforma automatizada: Ventana Benchmark Ultra, Roche	PD-L1, rabbit monoclonal, Clone E1L3N, Cell Signaling Technology, Inc. (diluição 1:200)

continua

Tabela 1 - Descrição dos anticorpos e metodologias (continuação)

Anticorpo	Metodologia	Especificações
OCT4	Plataforma automatizada: Autostainer Link 48, Dako	Octamer-Binding Transcription Factor 3/4, mouse monoclonal, Clone N1NK, Agilent Technologies (kit pronto)
SALL4	Plataforma automatizada: Ventana Benchmark Ultra, Roche	SALL4 antibody (385M-17), mouse monoclonal, Clone 6E3, Cell Marque (diluição: 1:25)
MCT1	Processo manual: Recuperação com tampão de citrato (0.01 M, pH=6), 98°C, 20 min, incubação: overnight	Anti-Monocarboxylate Transporter 1 Antibody, (AB3538P), rabbit polyclonal, Chemicon International (diluição: 1:1000)
MCT2	Processo manual: Recuperação com tampão de citrato (0.01 M, pH=6), 98°C, 20 min, incubação: 2H	Antibody MCT2 (H-40), rabbit polyclonal, sc-50322, Santa Cruz Biotechnology (diluição: 1:200)
MCT4	Processo manual: Recuperação com tampão de citrato (0.01 M, pH=6), 98°C, 20 min, incubação: 2H	Antibody MCT4 (H-90), sc-50329, rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology (diluição: 1:500)
CD147	Processo manual: Recuperação com EDTA (1 mM, pH=8), 98°C, 20 min, incubação: overnight	EMMPRIN Antibody (1.BB.218), sc-171038, mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology (diluição: 1:500)
CA IX	Processo manual: Recuperação com tampão de citrato (0.01 M, pH=6), 98°C, 20 min, incubação: 2H	Anti-Carbonic Anhydrase IX antibody (ab15086), rabbit polyclonal, Abcam (diluição: 1: 2000)
GLUT1	Processo manual: Recuperação com tampão de citrato (0.01 M, pH=6), 98°C, 20 min, incubação: 2H	Anti-Glucose Transporter GLUT1 antibody (ab15309), rabbit polyclonal, Abcam (diluição: 1:500)

Para os marcadores citoplasmáticos e de membrana, as reações foram analisadas de forma semi-quantitativa pela determinação da extensão da marcação, ou seja, a porcentagem estimada de marcação nas células tumorais e de forma semi-qualitativa pela intensidade de marcação. As reações foram classificadas semi-quantitativamente da seguinte forma: 0: 0% de células imunorreativas; 1: <25% de células imunorreativas; 2: 25-50% de células imunorreativas e 3: >50% de células imunorreativas. A intensidade da

coloração foi classificada semi-qualitativamente da seguinte forma: 0: negativo; 1: fraco; 2: intermediário e 3: forte. O *score* final foi determinado como a soma de ambos os parâmetros (extensão e intensidade) e as reações definidas como negativas ou positivas de acordo com os pontos de corte do *score* calculados para cada anticorpo. Como o estudo utilizou marcadores com intuito de avaliar seus valores prognósticos, os pontos de corte para os marcadores de citoplasma/membrana foram determinados pela análise da curva ROC (*receiver operating characteristic*), calculando-se os valores que maximizassem a sensibilidade e a especificidade na discriminação entre pacientes com desfechos clínicos desfavoráveis (óbito ou metástase após diagnóstico) dos pacientes com desfechos clínicos favoráveis.

Para os marcadores de expressão nuclear, foram somente consideradas positivas as colorações de intensidade moderada ou forte e em mais de 10% das células. Hiperexpressão foi definida como expressão positiva de um marcador nuclear em mais de 50% das células. A expressão proteica em outras localizações celulares também foi avaliada para a maioria dos anticorpos, embora somente os dados relevantes tenham sido incluídos na apresentação dos resultados do estudo.

Nos casos de marcação heterogênea entre os cilindros em duplicata, foram consideradas as maiores extensões e intensidades observadas. Em caso de perda de cilindros correspondentes a determinado caso nos dois TMAs ou se a morfologia esperada não estava representada nos cortes da imunohistoquímica, considerou-se como perda para o respectivo marcador. Todas reações foram sujeitas à avaliação independente por dois patologistas em

estudo duplo-cego. As avaliações discordantes foram revistas em conjunto e o resultado final foi considerado em consenso entre os dois observadores.

4.4 Dados clínico-demográficos

Através dos prontuários dos pacientes, arquivados no setor de Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do HCB, as informações clínicas e demográficas foram coletadas de acordo com instrumento de coleta específico (Anexo A). As informações coletadas incluíram sexo, idade no diagnóstico, etnia, tamanho do tumor, localização tecidual (osso ou partes moles), característica topográfica (axial ou periférico), extensão da doença no diagnóstico (localizada ou metastática), margens cirúrgicas, grau de necrose e progressão/recorrência da doença.

A idade dos pacientes no diagnóstico foi categorizada em dois grupos: indivíduos com 20 anos ou menos (≤ 20 anos) e adultos com mais de 20 anos (> 20 anos).

Para a característica étnica, utilizou-se como único critério a autodeclaração de cor, raça ou etnia fornecida pelos próprios pacientes, agrupando-os em duas categorias: brancos e não-brancos, incluindo nesta última negros, pardos, indígenas e de origem asiática.

Os tumores foram categorizados, de acordo com o tamanho, em grandes e pequenos e somente as medidas anteriores a qualquer tratamento foram incluídas. Para esta categorização, foram considerados como valores de corte as medidas, em centímetros, utilizadas no sistema TNM de estadiamento (8,0cm para tumores ósseos e 5,0cm para tumores de partes moles).

Os tumores originados em ossos, mesmo se houvesse acometimento de partes moles adjacentes, contanto que o maior volume ainda fosse ósseo, foram agrupados na categoria "osso" da localização tecidual do tumor. Analogicamente, os tumores categorizados como "partes moles" foram aqueles cujo maior volume tumoral se localizava em tecidos extra-ósseos. Para isso, foi necessária avaliação de exames de imagem e informações fornecidas pelos cirurgiões-ortopédicos. Em relação à característica topográfica dos tumores, aqueles localizados em tronco, cabeça e pescoço foram categorizados como "axiais" e os localizados nos membros como "periféricos".

Para os casos de pacientes submetidos à cirurgia para remoção dos tumores, foram incluídos os dados das margens cirúrgicas e do grau de necrose tumoral observados na peça cirúrgica e descritos pelo patologista. As margens cirúrgicas foram classificadas microscopicamente como "livres" se o tumor não tocava as bordas marcadas com tinta preta consideradas limites cirúrgicos e "comprometidas" quando estes limites coincidiam com alguma área tumoral.

O grau de necrose foi categorizado em 4 grupos de forma semelhante a classificação de Huvos, considerando-se a quantidade de tecido tumoral necrótico observado na peça cirúrgica: grau I (ausência de necrose ou necrose mínima), grau II (extensa necrose com mais de 10% de tumor viável), grau III (extensa necrose com esparsos focos de tumor viável) e grau IV (necrose completa).

A variável progressão/recorrência foi definida como o reaparecimento da neoplasia no mesmo local do tumor primário ou metástases durante ou após o término do tratamento. Para os casos de pacientes com doença metastática no

diagnóstico inicial, somente um ocasional segundo evento metastático foi considerado como progressão/recorrência.

Alguns dados clínico-patológicos não estavam disponíveis, ou por ausência destas informações nos prontuários médicos ou por não se aplicarem a determinados pacientes. Por exemplo, os pacientes que não foram submetidos à tratamento cirúrgico, como era de se esperar, não tiveram dados referentes às margens de ressecção cirúrgica e sobre o grau de necrose da peça cirúrgica.

4.5 Estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS para Windows, versão 21.0, com auxílio dos estatísticos do Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB) do HCB.

Para a categorização das expressões dos anticorpos de citoplasma/membrana, após a análise semi-quantitativa e semi-qualitativa, os valores de corte do *score* final foram determinados através da curva ROC. Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e seus respectivos intervalos de confiança de 95% foram estimados. Os pontos de corte determinados pela curva ROC foram os valores que maximizaram sensibilidade e especificidade na discriminação entre pacientes que apresentaram os eventos metástase ou morte dos pacientes que não apresentaram estes eventos.

Para todas as variáveis, incluindo os dados clínico-demográficos e resultados das reações imuno-histoquímicas, foram calculadas as frequências

e porcentagens. As associações entre a expressão imuno-histoquímica dos anticorpos e os dados clínico-demográficos foram realizadas por meio do teste do qui-quadrado de Pearson (χ^2 -teste) ou do teste exato de Fisher, dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência.

A análise da sobrevida global foi feita através da construção de curvas de Kaplan-Meier e para uma comparação entre as curvas obtidas foi aplicado o teste de log-rank. Ou seja, avaliamos se existia ou não diferença estatística entre as distribuições das curvas obtidas. A sobrevida global foi definida como o tempo entre a data do diagnóstico e a data da última informação ou morte do paciente por qualquer motivo. Com intuito de estimar o efeito conjunto das variáveis independentes na sobrevida, foi aplicada uma análise múltipla através do método de Regressão de Cox. Para tal, além da inclusão das variáveis que apresentaram significância estatística pela análise univariada, foram incluídas também as variáveis que apresentaram valor de p menor que 0,2 e, com os ajustes deste método exploratório, os fatores de prognóstico independentes foram determinados. O nível de significância definido foi de 0,05 (5%) para todos os testes aplicados.

4.6 Ética na pesquisa

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) sob o número 079/2015 (Anexo B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Hospital de Câncer Barretos (CEP-HCB) sob o número 935/2015 (Anexo C). Todos os gastos financeiros provenientes deste estudo foram arcados pelo próprio pesquisador,

não havendo outras fontes de financiamento. Todas as fases do estudo foram realizadas nas dependências do HCB.

Os dados dos pacientes foram obtidos exclusivamente de forma retrospectiva através dos prontuários e blocos de parafina, não sendo necessária, portanto, a utilização de termo de consentimento livre e esclarecido.

O sigilo de todos os indivíduos está garantido, não havendo divulgação pública do nome ou de qualquer outra informação que possa identificar o envolvimento dos mesmos neste estudo. Devido à necessidade de se manter material estocado no Departamento de Patologia para possíveis testes diagnósticos futuros, os blocos de parafina não foram esgotados ou prejudicados. Assim, trata-se de pesquisa com um risco mínimo ao participante. Não haverá benefício direto ao participante, no entanto, futuros pacientes diagnosticados com TFSE poderão se beneficiar do conhecimento gerado durante este estudo.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

Foram analisados 113 casos de TFSE, dos quais 77 eram do sexo masculino e 36 do sexo feminino (relação de cerca de 2:1). Em relação a etnia, 93 pacientes (83%) se autodeclararam brancos e 19 (17%) não-brancos. A idade variou entre 2 e 67 anos, com média de 19 anos (desvio padrão: 12) e mediana de 17 anos (Q1: 12 e Q3: 21). Quando categorizados, 74 pacientes (65,5%) eram crianças, adolescentes ou adultos jovens com 20 anos ou menos e 39 pacientes (34,5%) eram adultos com mais de 20 anos.

Houve similaridade em relação à característica topográfica dos tumores, observando-se 59 tumores axiais (52,2%) e 54 tumores periféricos (47,8%). Quanto à localização tecidual, 66 tumores eram primariamente ósseos (58,4%) e 47 (41,6%) originados de partes moles. Os ossos mais frequentemente acometidos foram fêmur (13,3%) e pelve (13,3%), seguidos por tibia (8%), úmero (6,2%) e fíbula (4,4%). Os tecidos moles mais frequentemente acometidos foram os do tronco (18%), coxa/glúteo (8,8%) e cabeça e pescoço (8%). As medidas dos tumores variaram entre 3,3 cm e 35,0 cm, com média de 12,2 cm (desvio padrão: 5,8) e mediana de 11,0 cm (Q1: 8,5 e Q3: 14,5). Os tumores considerados grandes corresponderam à maioria da amostra, com 69 casos (88,5%) contra 9 (11,5%) categorizados como pequenos.

Em relação à extensão da doença, 55 pacientes (50,5%) já continham metástases no momento do diagnóstico, enquanto 54 pacientes (49,5%) apresentavam doença localizada. Os locais mais comuns de metástase foram os pulmões, com 40,7% dos casos, e os ossos, com 17,7% dos casos. Quanto

ao tratamento, 85 pacientes (75,9%) foram submetidos à quimioterapia neoadjuvante e 96 (86,5%) à quimioterapia adjuvante. Tratamento radioterápico também foi administrado em 75 pacientes (67,6%) e cirurgia em 61 pacientes (54,5%). A maioria das ressecções cirúrgicas (85,7%) foram realizadas com preservação do membro afetado. Margens cirúrgicas livres de neoplasia foram alcançadas em 80,7% dos casos operados.

Progressão/recorrência da doença ocorreu em 51 pacientes (47,7%), sendo recidiva local observada em 28 pacientes (26,4%) e metástases em 43 pacientes (40,2%).

As características clínico-patológicas dos pacientes com TFSE estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características clínico-patológicas dos pacientes com TFSE (Hospital de Câncer de Barretos, 2001 - 2014)

Variável	Categoria	N (%)
Sexo	Feminino	36 (31,9)
	Masculino	77 (68,1)
Etnia	Branca	93 (83,0)
	Não Branca	19 (17,0)
Idade	≤ 20 anos	74 (65,5)
	> 20 anos	39 (34,5)
Tamanho do tumor	Pequeno ¹	9 (11,5)
	Grande	69 (88,5)
Localização tecidual do tumor	Osso	66 (58,4)
	Partes Moles	47 (41,6)
Característica topográfica do tumor	Axial	59 (52,2)
	Periférico	54 (47,8)
Extensão da doença no diagnóstico	Localizada	54 (49,5)
	Metastática	55 (50,5)
Margens cirúrgicas ²	Livres	46 (80,7)
	Comprometidas	11 (19,3)
Grau de necrose ²	I	13 (35,1)
	II	9 (24,3)
	III	4 (10,8)
	IV	11 (29,7)
Progressão/Recorrência	Não	56 (52,3)
	Sim	51 (47,7)
Status	Vivo sem doença	30 (26,5)
	Vivo com doença	11 (9,7)
	Óbito por câncer	71 (62,8)
	Óbito por outras causas	1 (0,9)

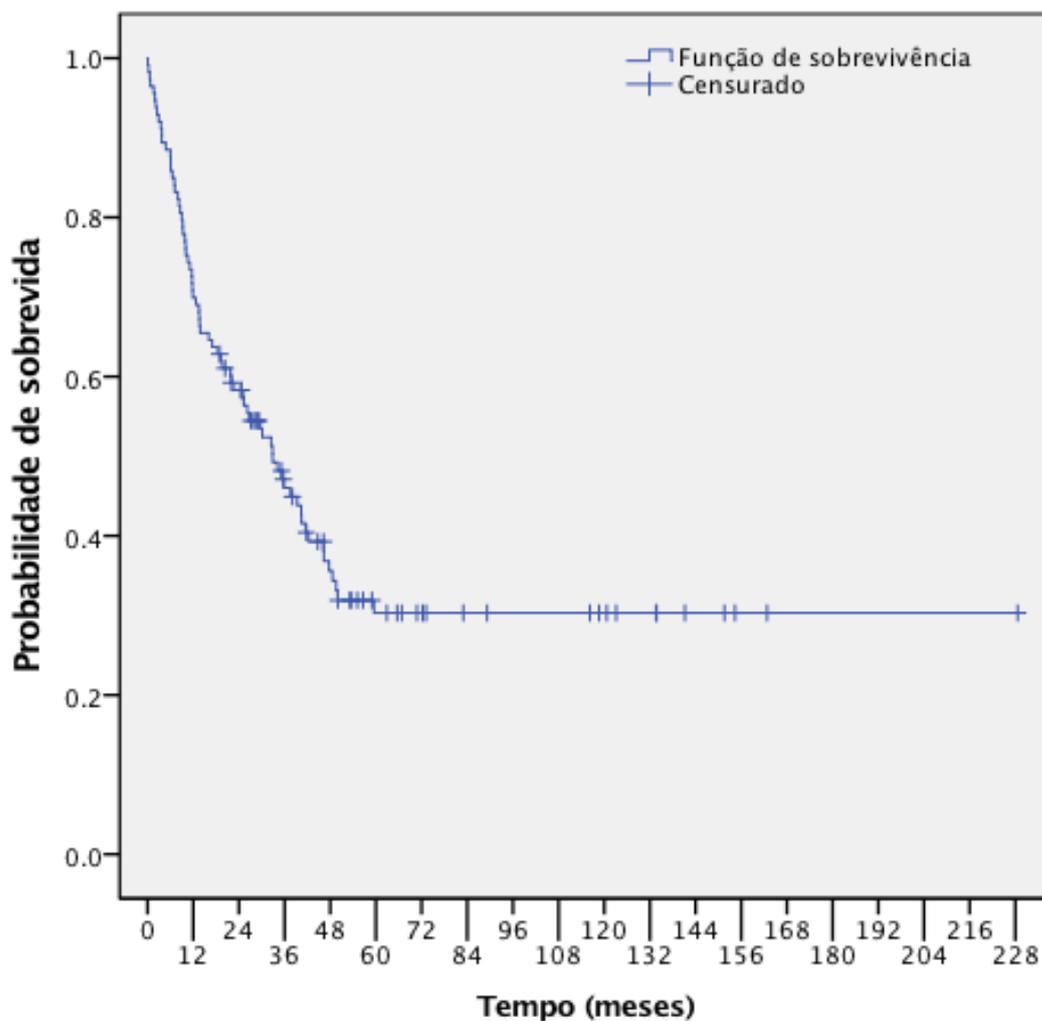
1. ≤ 8 cm em osso ou ≤ 5 cm em partes moles;

2. Número de casos operados e com a informação disponível.

A média de tempo de seguimento foi de 38,8 meses (desvio padrão: 41,2), variando entre 0,03 e 228,6 meses. A taxa de sobrevida global em 1 ano foi de 69,9%, em 3 anos de 46% e em 5 anos de 30,3%.

O Gráfico 1 apresenta a curva de sobrevida global da série de pacientes com TFSE.

Gráfico 1 - Curva de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier



5.2 Estudo dos pontos de corte dos biomarcadores

Os pontos de corte de cada anticorpo de citoplasma ou membrana, calculados pela curva ROC e suas respectivas sensibilidade, especificidade e intervalos de confiança de 95% estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Pontos de corte dos anticorpos de acordo com a probabilidade preditiva de prognóstico

Anticorpo	Ponto de corte*	Sensibilidade % (IC)	Especificidade % (IC)	VPP % (IC)	VPN % (IC)
RKIP	5	80,3 (69,5 - 88,5)	27,6 (12,7 - 47,2)	74,4 (63,6 - 83,4)	34,8 (16,4 - 57,3)
PTEN	5	39,2 (28 - 51,2)	75,9 (56,5 - 89,7)	80,6 (64 - 91,8)	32,9 (21,9 - 45,4)
USP22	5	82,4 (71,8 - 90,3)	40 (22,7 - 59,4)	77,2 (66,4 - 85,9)	48 (27,8 - 68,7)
MCT1	5	56,9 (44,7 - 68,6)	80,6 (62,5 - 92,6)	87,2 (74,3 - 95,2)	44,6 (31,3 - 58,5)
CA IX	5	52,8 (40,6 - 64,7)	28,6 (13,2 - 48,7)	52,8 (40,6 - 64,7)	28,6 (13,2 - 48,7)
GLUT1	5	22,3 (13,6 - 33,4)	93,3 (77,9 - 99,2)	89,5 (66,9 - 98,7)	32,2 (22,6 - 43)
MTAP	3	30,8 (20,8 - 42,2)	78,8 (61 - 91)	77,4 (58,9 - 90,4)	32,5 (22,4 - 43,9)
p16	3	71 (59,5 - 80,9)	34,5 (17,9 - 54,3)	74 (62,4 - 83,6)	31,2 (16,1 - 50)
CD147	3	34,7 (23,8 - 46,7)	73,3 (54,1 - 87,7)	75,8 (57,7 - 88,9)	31,9 (21,1 - 44,2)
PD-L1	3	19,7 (11,2 - 30,9)	88,5 (69,9 - 97,6)	82,3 (56,6 - 96,2)	28,7 (19,2 - 40)
MCT2	2	31,5 (21,1 - 43,4)	81,5 (61,9 - 93,7)	82,1 (63,1 - 93,9)	30,6 (20,2 - 42,5)
MCT4	2	45,5 (34 - 57,2)	66,7 (47,2 - 82,7)	77,8 (62,9 - 88,8)	32,3 (20,9 - 45,3)

*O ponto de corte ideal foi determinado como o valor que simultaneamente maximizou sensibilidade e especificidade. **VPP**: Valor preditivo positivo; **VPN**: Valor preditivo negativo; **IC**: Intervalo de confiança de 95%

5.3 Resultados do estudo imuno-histoquímico

Considerando-se os marcadores com expressão predominante no citoplasma, as maiores frequências de expressão positiva ocorreram com RKIP, em 82 casos (78,1%), MTAP em 80 casos (72,1%), p16 em 73 casos

(69,5%) e PTEN, em 67 casos (65%). Lembrando que, com estes quatro marcadores, os casos com perda ou diminuição da expressão eram os considerados biologicamente alterados, ou seja, com deficiência da proteína e, portanto, eram os de maior interesse para as associações com prognóstico. A menor frequência de expressão citoplasmática positiva foi observada com USP22, em 48 casos (46,2%) no entanto a análise adicional da expressão nuclear deste marcador demonstrou positividade em uma parcela maior dos tumores, o que ocorreu em 70 casos (67,3%). A Figura 16 mostra a imunoeexpressão dos anticorpos acima citados.

Entre os marcadores caracteristicamente expressos na membrana, a maior frequência de expressão positiva ocorreu com MCT1, em 47 casos (44,8%) e as menores ocorreram com GLUT1, em 19 casos (17,9%) e PD-L1, em 17 casos (17,5%). A Figura 17 mostra a expressão imuno-histoquímica dos marcadores de membrana relacionados ao metabolismo celular e a Figura 18 mostra a expressão de PD-L1.

Em relação aos marcadores nucleares, Ciclina D1 apresentou hiperexpressão em 74 casos (72,5%). A proteína p53 apresentou hiperexpressão em 18 casos (17,3%). STAG2, cuja importância está associada à sua deficiência, mostrou perda de expressão em 26 casos (24,8%). Expressão positiva para o marcador Brachyury ocorreu em 49 casos (51%). OCT4, com nenhum caso (0%), e SALL4, com 2 casos (1,9%), foram os marcadores com as menores frequências de casos positivos. A Figura 19 mostra a imunoeexpressão dos marcadores nucleares.

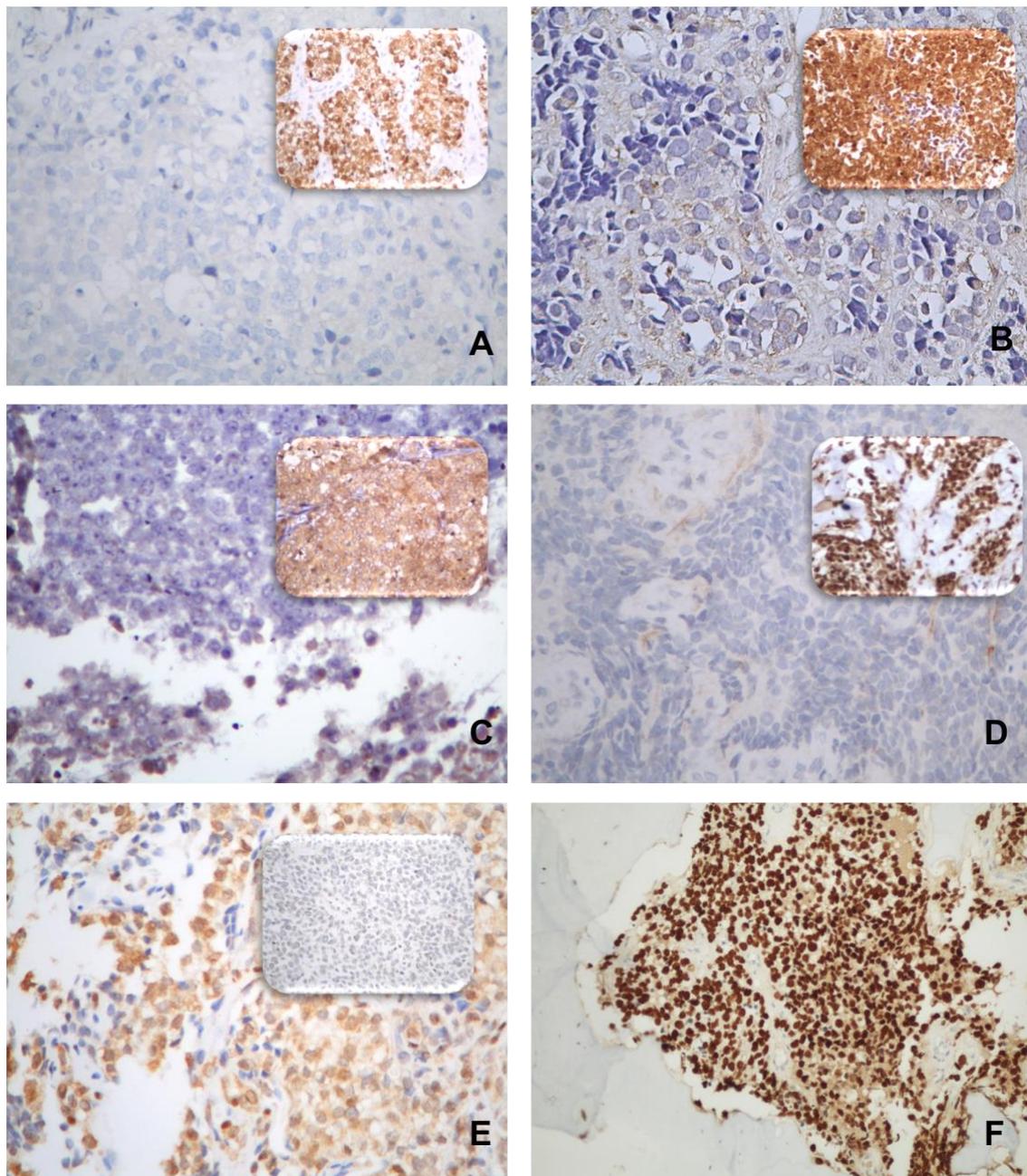


Figura 16 - Imagens de exemplares dos marcadores citoplasmáticos (400X).A: p16 negativo (quadro menor: exemplo de caso positivo); B: PTEN negativo (quadro menor: exemplo de caso positivo) C: MTAP negativo (quadro menor: exemplo de caso positivo); D: RKIP negativo (quadro menor: exemplo de caso positivo); E: USP22 positivo no citoplasma (quadro menor: exemplo de caso negativo); F: USP22 positivo no núcleo

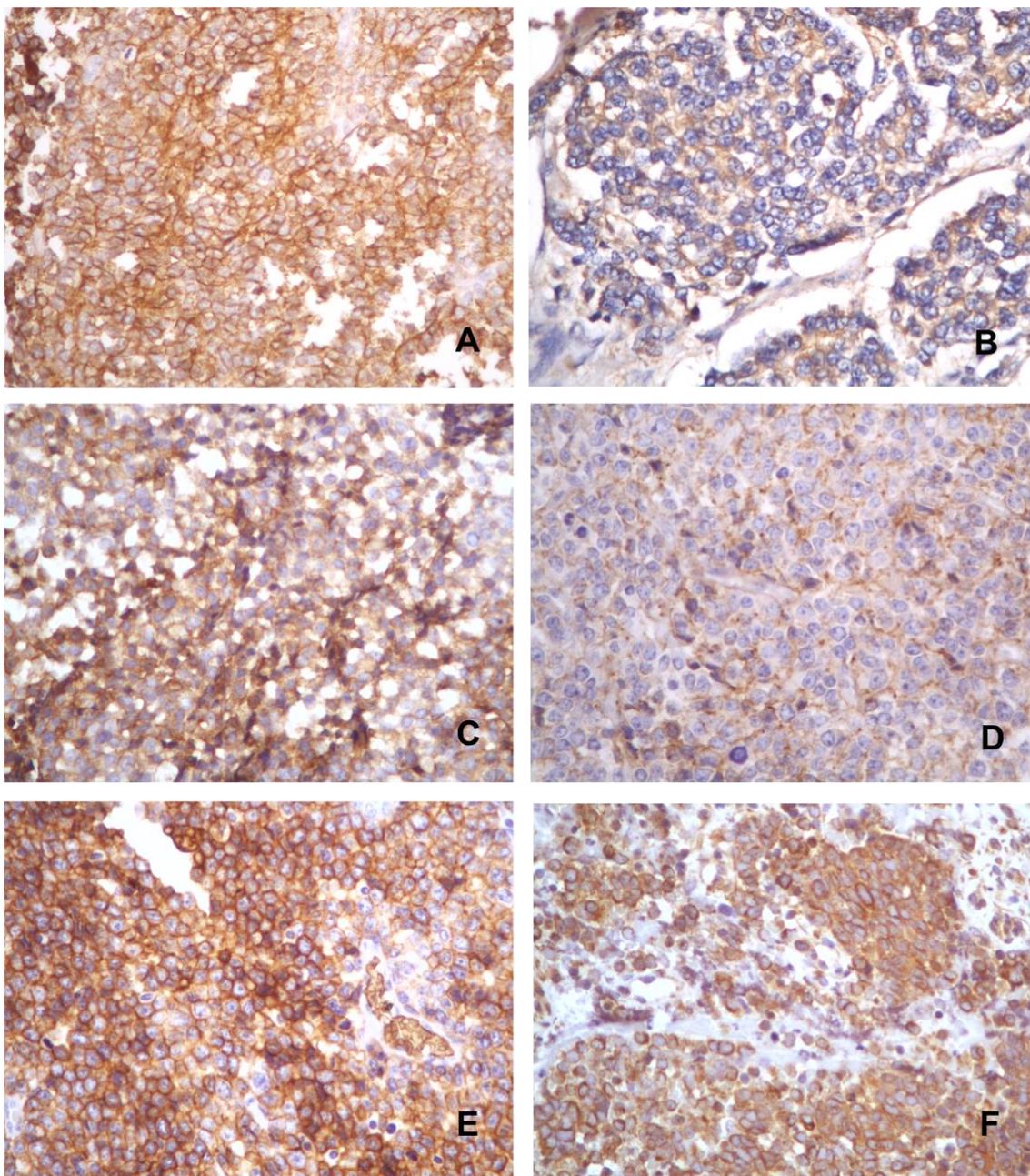


Figura 17 - Imagens de exemplares positivos dos marcadores de membrana (400X).
A: MCT1; B: MCT2; C: MCT4; D: CD147; E: GLUT1; F: CA IX

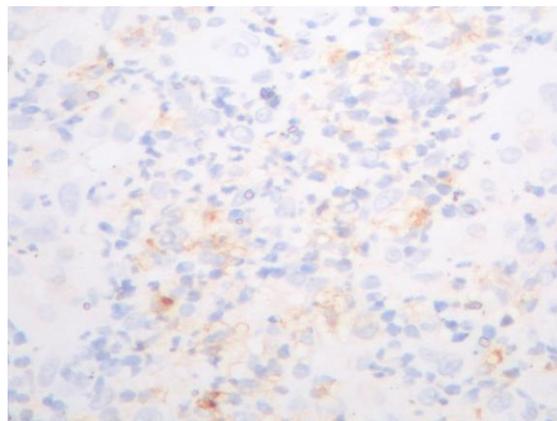


Figura 18 - Fotografia de um caso classificado como positivo para PD-L1 (400X). Observa-se intensidade de marcação fraca e expressão em cerca de 30% das células neoplásicas (score final: 3)

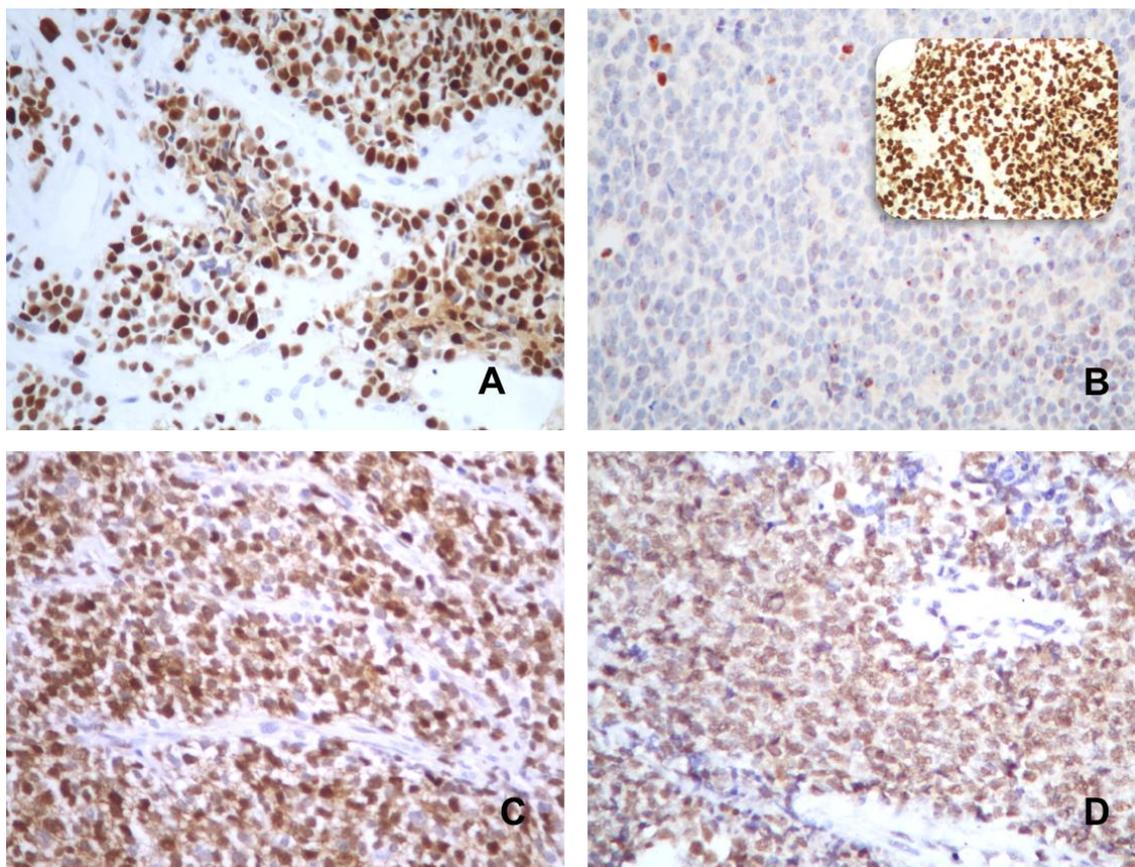


Figura 19 - Imagens de exemplares dos marcadores nucleares (400X) A: hiperexpressão de p53; B: perda de expressão de STAG2 (quadro menor: exemplo de caso positivo); C: hiperexpressão de Ciclina D1; D: Brachyury positivo

5.4 Associação dos biomarcadores com dados clínico-patológicos

Observaram-se associações estatisticamente significativas entre alguns biomarcadores e dados clínico-patológicos pelos testes de *qui*-quadrado (χ^2) de Pearson ou exato de Fisher. A hiperexpressão de p53 se associou com doença metastática no diagnóstico ($p = 0,017$) e idade acima de 20 anos ($p = 0,04$). Os marcadores USP22 ($p = 0,017$) e GLUT1 (0,004) demonstraram associações estatisticamente significativas com a localização óssea dos tumores, enquanto MCT2 ($p = 0,009$) se associou com tumores de partes moles. A expressão positiva do marcador Brachyury apresentou associação significativa com etnia não-branca ($p = 0,04$) e topografia axial dos tumores ($p = 0,025$). A Tabela 4 descreve os resultados das associações dos biomarcadores p53, USP22, GLUT1, MCT2 e Brachyury com as características clínico-patológicas. Os demais biomarcadores (Ciclina D1, p16, MTAP, STAG2, PTEN, RKIP, PD-L1, MCT1, MCT4, CD147, CA IX, OCT4 e SALL4) não apresentaram associação significativa com as características clínico-patológicas, como mostra a Tabela 5.

Tabela 4 - Associação entre dados clínico-patológicos e p53, USP22, MCT2, GLUT1 e Brachyury

	p53		USP22		MCT2		GLUT1		Brachyury	
	Hiperexpressão n (%)	p	Positivo n (%)	p						
Sexo										
Feminino	8 (24,2)	0,203	18 (52,9)	0,333	9 (30,0)	0,771	7 (21,2)	0,553	17 (53,1)	0,773
Masculino	10 (14,1)		30 (42,9)		19 (27,1)		12 (16,4)		32 (50,0)	
Etnia										
Branca	15 (17,2)	0,999*	39 (45,9)	0,75	21 (25,6)	0,239*	16 (18,4)	0,999*	37 (46,8)	0,04
Não-branca	3 (18,8)		9 (50,0)		7 (41,2)		3 (16,7)		12 (75,0)	
Idade										
≤ 20 anos	8 (11,8)	0,04	36 (52,9)	0,056	18 (27,3)	0,821	14 (20,0)	0,437	35 (53,8)	0,426
> 20 anos	10 (27,8)		12 (33,3)		10 (29,4)		5 (13,9)		14 (45,2)	
Tamanho do tumor										
Pequeno	1 (12,5)	0,999*	4 (50,0)	0,999*	4 (57,1)	0,182*	3 (37,5)	0,146*	4 (80,0)	0,641*
Grande	12 (19,0)		32 (49,2)		16 (26,2)		10 (15,4)		35 (57,4)	
Localização tecidual										
Osso	9 (14,8)	0,412	35 (55,6)	0,017	12 (19,0)	0,009	17 (26,6)	0,004	29 (50,9)	0,969
Partes Moles	9 (20,9)		13 (31,7)		16 (43,2)		2 (4,8)		20 (51,3)	
Característica topográfica										
Axial	7 (13,5)	0,3	22 (42,3)	0,431	14 (29,8)	0,708	8 (15,1)	0,447	30 (62,5)	0,025
Periférico	11 (21,2)		26 (50,0)		14 (26,4)		11 (20,8)		19 (39,6)	
Extensão da doença no diagnóstico										
Localizada	4 (8,0)	0,017	27 (54,0)	0,161	13 (27,1)	0,999	10 (19,6)	0,603	23 (52,3)	0,986
Metastática	13 (26,0)		20 (40,0)		13 (27,1)		8 (15,7)		25 (52,1)	
Grau de necrose										
I	2 (15,4)		4 (33,3)		7 (53,8)		2 (15,4)		4 (40,0)	
II	3 (33,3)	0,187*	4 (44,4)	0,106*	1 (12,5)	0,164*	4 (44,4)	0,479*	3 (37,5)	0,176*
III	0 (0,0)		1 (25,0)		2 (50,0)		1 (25,0)		1 (25,0)	
IV	0 (0,0)		8 (80,0)		2 (20,0)		2 (18,2)		8 (80,0)	

Teste de qui-quadrado, exceto * (Fisher)

Tabela 5 - Associação entre dados clínico-patológicos e os demais biomarcadores

	Ciclina D1		p16		MTAP		STAG2		PTEN		RKIP	
	Hiperexpressão n (%)	p	Negativo n (%)	p								
Sexo												
Feminino	30 (90,9)	0,329	9 (27,3)	0,133	14 (40,0)	0,724	7 (20,6)	0,493	11 (33,3)	0,813	8 (24,2)	0,695
Masculino	58 (84,1)		23 (31,9)		27 (35,5)		19 (26,8)		25 (35,7)		15 (20,8)	
Etnia												
Branca	74 (87,1)	0,759*	29 (33,3)	0,640	33 (35,9)	0,595	21 (24,4)	0,769*	31 (36,0)	0,393	19 (21,8)	0,999*
Não-branca	13 (81,2)		2 (11,8)		8 (44,4)		5 (27,8)		4 (25,0)		3 (17,6)	
Idade												
≤ 20 anos	60 (89,6)	0,776	20 (29,0)	0,599	26 (36,1)	0,962	18 (26,5)	0,582	21 (30,9)	0,227	14 (20,6)	0,658
> 20 anos	28 (80,0)		12 (33,3)		15 (38,5)		8 (21,6)		15 (42,9)		9 (24,3)	
Tamanho do tumor												
Pequeno	8 (100)	0,670*	2 (25,0)	0,466*	3 (37,5)	0,259*	0 (0,0)	0,187*	4 (50,0)	0,432*	1 (12,5)	0,999*
Grande	51 (83,6)		18 (28,6)		28 (41,2)		16 (24,6)		20 (32,3)		13 (20,3)	
Localização tecidual												
Ossos	53 (89,8)	0,059	19 (30,6)	0,806	23 (35,4)	0,948	16 (26,2)	0,682	19 (31,7)	0,409	13 (21,0)	0,780
Partes Moles	35 (81,4)		13 (30,2)		18 (39,1)		10 (22,7)		17 (39,5)		10 (23,3)	
Característica topográfica												
Axial	45 (86,5)	0,903	14 (26,4)	0,607	21 (36,8)	0,973	11 (20,0)	0,236	21 (40,4)	0,243	14 (26,4)	0,259
Periférico	43 (86,0)		18 (34,6)		20 (37,0)		15 (30,0)		15 (29,4)		9 (17,3)	
Extensão da doença no diagnóstico												
Localizada	44 (88,0)	0,088	16 (31,4)	0,491	20 (37,7)	0,880	11 (22,0)	0,855	14 (28,0)	0,179	10 (20,0)	0,667
Metastática	41 (85,4)		16 (32,0)		21 (38,9)		12 (23,5)		20 (40,8)		12 (23,5)	
Grau de necrose												
I	12 (100)		3 (23,1)		3 (23,1)		3 (25,0)		2 (16,7)		1 (8,3)	
II	6 (75,0)	0,942*	2 (22,2)	0,724*	5 (55,6)	0,215*	3 (33,3)	0,635*	5 (55,6)	0,151*	2 (22,2)	0,775*
III	3 (75,0)		1 (25,0)		3 (75,0)		1 (25,0)		0 (0,0)		0 (0,0)	
IV	10 (90,9)		5 (45,5)		4 (36,4)		1 (9,1)		4 (36,4)		2 (18,2)	

Teste de qui-quadrado, exceto* (Fisher)

continua

Tabela 5 - Associação entre dados clínico-patológicos e os demais biomarcadores (continuação)

	PD-L1		MCT1		MCT4		CD147		CA IX		SALL4	
	Positivo n (%)	p										
Sexo												
Feminino	5 (15,6)	0,730	16 (45,7)	0,890	14 (40,0)	0,764	11 (34,4)	0,768	15 (50,0)	0,289	0 (0)	0,999*
Masculino	12 (18,5)		31 (44,3)		31 (44,3)		22 (31,4)		27 (38,6)		2 (2,7)	
Etnia												
Branca	13 (16,5)	0,493*	38 (43,2)	0,613	35 (40,2)	0,322	25 (30,1)	0,240	35 (42,7)	0,574	1 (1,1)	0,999*
Não-branca	4 (23,5)		8 (50,0)		10 (52,6)		8 (44,4)		6 (35,3)		1 (5,9)	
Idade												
≤ 20 anos	13 (20,0)	0,361	30 (43,5)	0,714	28 (39,4)	0,441	23 (33,8)	0,653	26 (37,7)	0,192	1 (1,5)	0,999*
> 20 anos	4 (12,5)		17 (47,2)		17 (47,2)		10 (29,4)		16 (51,6)		1 (2,6)	
Tamanho do tumor												
Pequeno	3 (60,0)	0,073*	3 (37,5)	0,999*	2 (25,0)	0,703*	1 (14,3)	0,408*	3 (37,5)	0,999*	0 (0,0)	0,999*
Grande	12 (19,7)		28 (43,8)		24 (36,9)		24 (38,1)		27 (44,3)		1 (1,5)	
Localização tecidual												
Ossos	12 (21,1)	0,275	25 (40,3)	0,272	24 (37,5)	0,244	21 (33,9)	0,683	26 (41,9)	0,987	1 (1,6)	0,999*
Partes Moles	5 (12,5)		22 (51,2)		21 (48,8)		12 (30,0)		16 (42,1)		1 (2,3)	
Característica topográfica												
Axial	8 (16,3)	0,754	23 (44,2)	0,914	26 (48,1)	0,198	17 (34,0)	0,727	21 (41,2)	0,865	1 (1,9)	0,999*
Periférico	9 (18,8)		24 (45,3)		19 (35,8)		16 (30,8)		21 (42,9)		1 (1,9)	
Extensão da doença no diagnóstico												
Localizada	9 (20,9)	0,377	19 (38,0)	0,132	19 (37,3)	0,600	13 (27,1)	0,176	20 (42,6)	0,956	1 (1,9)	0,999*
Metastática	7 (14,0)		27 (52,9)		22 (42,3)		20 (40,0)		21 (42,0)		1 (2,0)	
Grau de necrose												
I	1 (10,0)		4 (30,8)		8 (61,5)		3 (25,0)		6 (54,5)		0 (0,0)	
II	2 (25,0)	0,866*	5 (55,6)	0,318*	5 (55,6)	0,248*	3 (37,5)	0,691*	2 (28,6)	0,747*	0 (0,0)	0,999*
III	1 (25,0)		3 (75,0)		2 (50,0)		0 (0,0)		2 (50,0)		0 (0,0)	
IV	2 (20,0)		3 (30,0)		2 (20,0)		3 (30,0)		5 (45,5)		0 (0,0)	

Teste de qui-quadrado, exceto * (Fisher). OCT4 não foi incluído na tabela pois não houve nenhum caso positivo.

5.5 Associação dos biomarcadores com o prognóstico

5.5.1 Análise simples

Houve associação significativa entre a expressão dos biomarcadores MTAP, p53, USP22, MCT1 e GLUT1 e a sobrevida global, de acordo com os métodos de Kaplan-Meier e log-rank, como pode ser observado na Tabela 6. Os Gráficos 2-6 mostram as curvas de sobrevida para cada um destes biomarcadores.

Tabela 5 - Probabilidade de sobrevida global dos pacientes com TFSE para a expressão dos biomarcadores MTAP, p53, USP22, MCT1 e GLUT1

Biomarcador		Nº de casos	Nº de óbitos	Sobrevida Global			p-valor
				1 ano	3 anos	5 anos	
MTAP	Negativo	31	24	58,1%	37,3%	11,5%	0,028
	Positivo	80	46	75,0%	50,7%	37,2%	
p53	Baixa expressão	86	50	75,6%	55,7%	35,7%	< 0,001
	Hiperexpressão	18	17	38,9%	0,0%	0,0%	
USP22	Negativo	56	45	60,7%	30,4%	9,7%	< 0,001
	Positivo	48	23	79,2%	59,1%	47,9%	
MCT1	Negativo	58	30	79,3%	60,3%	39,3%	0,002
	Positivo	47	37	57,4%	30,1%	17,5%	
GLUT1	Negativo	87	53	75,9%	50,1%	32,9%	0,04
	Positivo	19	15	47,4%	29,6%	15,8%	

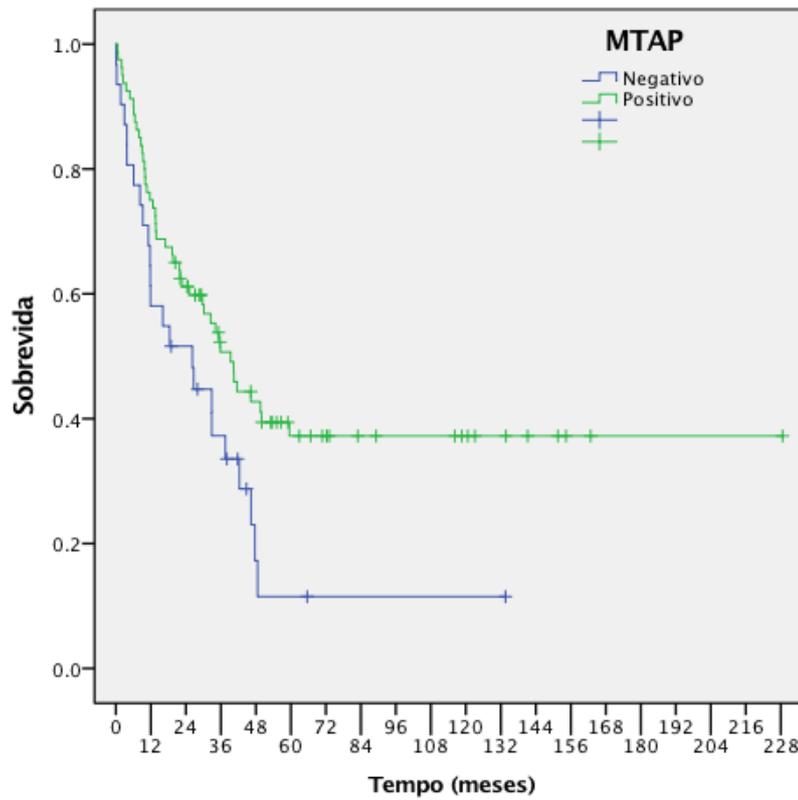
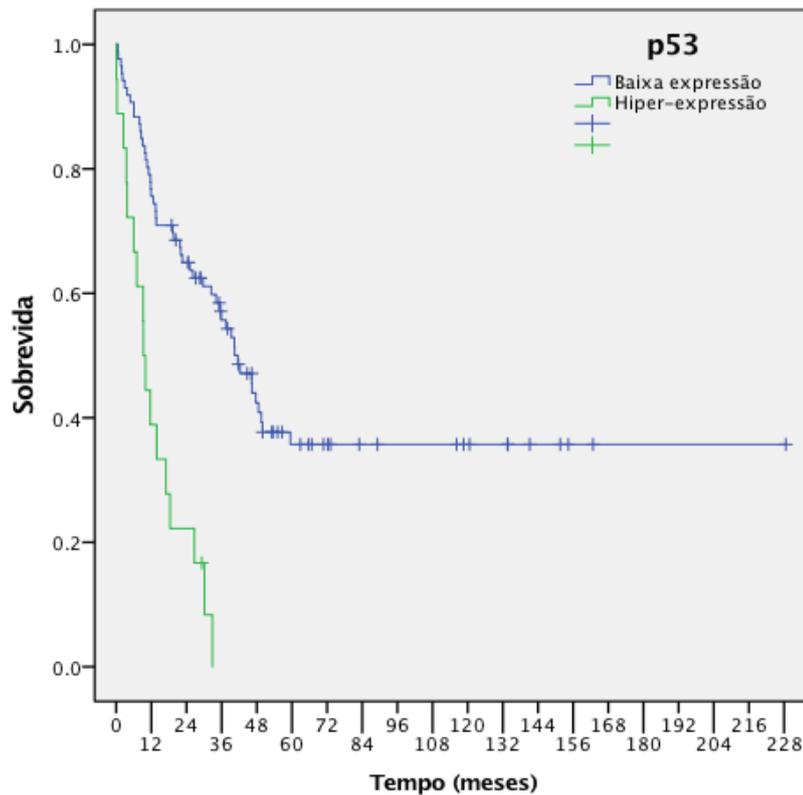
Gráfico 2 - Curvas de sobrevida global para o biomarcador MTAP**Gráfico 3 -** Curvas de sobrevida global para o biomarcador p53

Gráfico 4 - Curvas de sobrevida global para o biomarcador USP22

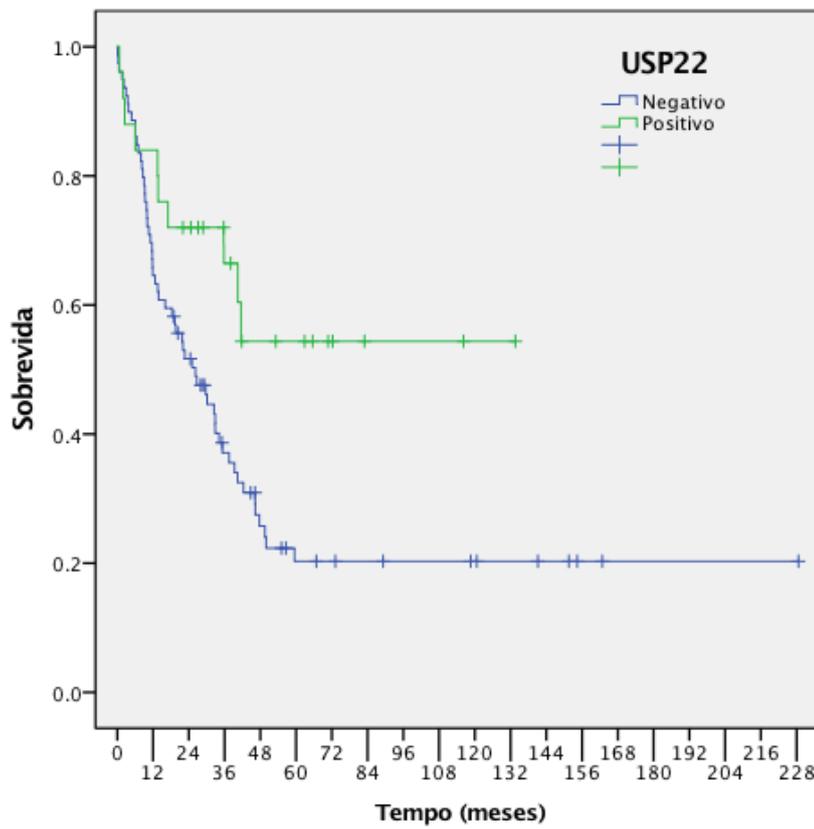


Gráfico 5 - Curvas de sobrevida global para o biomarcador MCT1

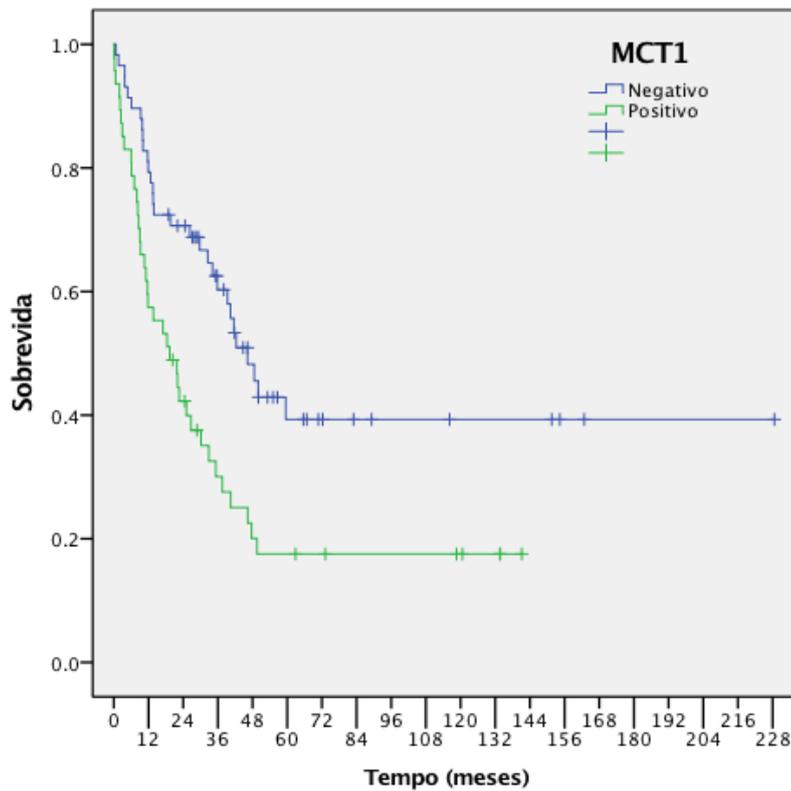
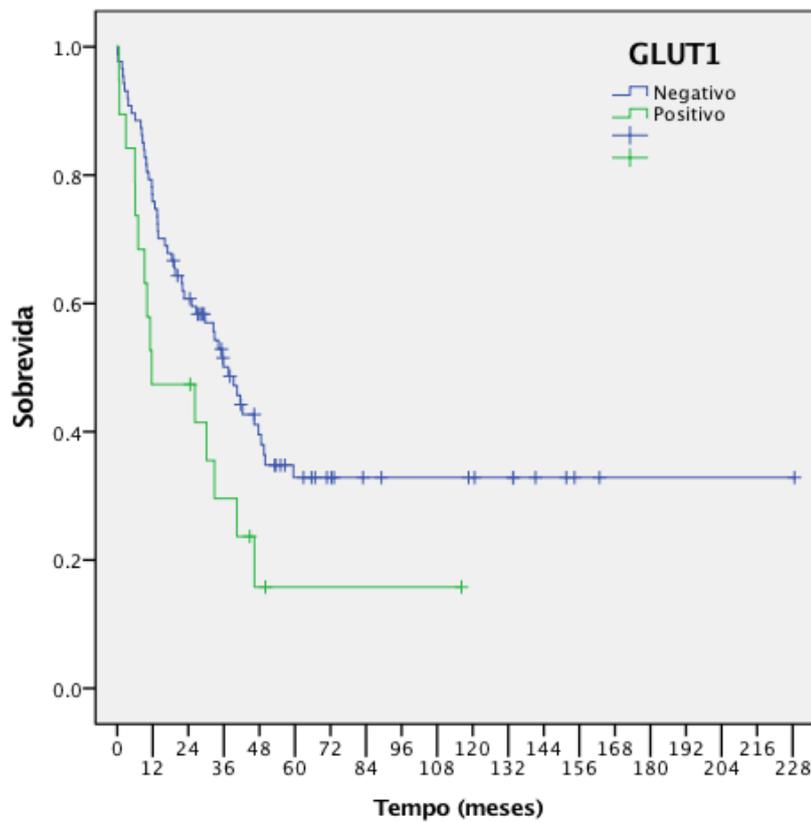


Gráfico 6 - Curvas de sobrevida global para o biomarcador GLUT1

Os demais biomarcadores não apresentaram associação significativa com sobrevida global pela análise simples, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 6 - Probabilidade de sobrevida global dos pacientes com TFSE para a expressão dos demais biomarcadores

Biomarcador	Nº de casos	Nº de óbitos	Sobrevida Global			p-valor	
			1 ano	3 anos	5 anos		
p16	Negativo	43	19	71,9%	52,1%	34,7%	0,27
	Positivo	62	49	68,5%	43,4%	26,8%	
Ciclina D1	Baixa expressão	28	20	60,7%	36,8%	24,5%	0,25
	Hiperexpressão	74	45	71,6%	49,9%	32,8%	
STAG2	Negativo	26	21	61,5%	31,8%	13,6%	0,069
	Positivo	79	47	72,2%	49,1%	35,1%	
PTEN	Negativo	36	25	63,9%	39,1%	26,0%	0,337
	Positivo	67	41	71,6%	51,2%	32,2%	
RKIP	Negativo	23	15	65,2%	42,5%	31,9%	0,834
	Positivo	82	53	69,5%	47,3%	28,9%	
MCT2	Negativo	72	46	66,7%	43,4%	32,3%	0,881
	Positivo	28	20	75,0%	47,7%	21,7%	
MCT4	Negativo	62	39	67,7%	48,7%	31,4%	0,37
	Positivo	45	31	71,1%	40,0%	24,6%	
CD147	Negativo	69	42	75,4%	51,2%	33,9%	0,073
	Positivo	33	24	57,6%	32,8%	19,1%	
CA IX	Negativo	58	36	70,7%	48,0%	36,1%	0,313
	Positivo	42	30	66,7%	41,8%	23,6%	
Brachyury	Negativo	47	36	61,7%	37,8%	22,2%	0,156
	Positivo	49	27	75,5%	52,7%	34,7%	
PD-L1	Negativo	80	53	70,0%	45,7%	27,5%	0,324
	Positivo	17	12	52,9%	34,3%	25,7%	
OCT4	Negativo	107	69	69,2%	45,9%	29,4%	-----
	Positivo	0	0	0,0%	0,0%	0,0%	
SALL4	Negativo	105	68	69,5%	46,0%	29,0%	0,65
	Positivo	2	1	50,0%	50,0%	50,0%	

Algumas características clínico-patológicas também se associaram com a sobrevida global, como é observado na Tabela 8. Pacientes brancos tiveram desfechos clínicos significativamente melhores do que os pacientes não-brancos ($p = 0,002$), enquanto doença metastática no diagnóstico e idade acima de 20 anos se associaram com menores taxas de sobrevida ($p = 0,003$ e $p = 0,023$, respectivamente).

Tabela 7 - Sobrevida global para as características clínico-patológicas

Variável	Nº de casos	Nº de óbitos	Sobrevida Global (%)			p-valor
			1 ano	3 anos	5 anos	
Sexo						
Feminino	36	20	75,0%	49,3%	36,1%	0,476
Masculino	77	52	67,5%	44,7%	27,7%	
Etnia						
Branca	93	54	74,2%	51,9%	35,7%	0,002
Não Branca	19	17	52,6%	21,1%	7,0%	
Idade						
≤ 20 anos	74	44	75,7%	54,5%	35,8%	0,023
> 20 anos	39	28	59,0%	26,9%	17,9%	
Tamanho do tumor						
Pequeno	9	4	88,9%	55,6%	55,6%	0,162
Grande	69	47	65,2%	43,1%	24,1%	
Localização tecidual						
Osso	66	45	74,2%	42,6%	26,5%	0,602
Partes Moles	47	27	63,8%	52,2%	37,0%	
Característica topográfica do tumor						
Axial	59	38	67,8%	41,8%	32,2%	0,614
Periférico	54	34	72,2%	50,4%	31,7%	
Extensão da doença no diagnóstico						
Localizada	54	27	79,6%	61,7%	43,1%	0,003
Metastática	55	42	60,0%	29,0%	20,1%	
Margens cirúrgicas						
Livres	46	25	93,5%	68,5%	38,0%	0,634
Comprometidas	11	5	72,7%	47,7%	47,7%	
Grau de necrose						
I	13	9	100,0%	44,9%	23,9%	0,058
II	9	5	77,8%	48,6%	32,4%	
III	4	3	100,0%	100,0%	25,0%	
IV	11	2	100,0%	100,0%	76,2%	

5.5.2 Análise múltipla

Pelo método de Regressão múltipla de Cox, os biomarcadores MTAP ($p = 0,039$), p53 ($p < 0,001$) e Brachyury ($p = 0,008$) foram identificados como marcadores independentes de prognóstico, mostrando associação estatisticamente significativa com a sobrevida global. Entre as características clínicas, etnia ($p = 0,001$) e extensão da doença no diagnóstico ($p = 0,002$) apresentaram impacto na sobrevida global de forma independente. A Tabela 9 apresenta as estimativas de risco relativo de acordo com os resultados da Regressão múltipla de Cox.

Tabela 8 - Risco Relativo pelo Modelo de Cox Múltiplo para sobrevida global

Variáveis	Nº de casos	Nº de óbitos	Risco relativo	IC 95%		Valor p
				Inferior	Superior	
Etnia						
Branca	93	54	1	----	----	0,001
Não-branca	19	17	3,401	1,643	7,037	
Extensão da doença no diagnóstico						
Localizada	54	27	1	----	----	0,002
Metastática	55	42	2,476	1,400	4,377	
MTAP						
Negativo	31	24	1,818	1,029	3,215	0,039
Positivo	80	46	1	----	----	
p53						
Baixa expressão	86	50	1	----	----	< 0,001
Hiper-expressão	18	17	3,368	1,737	6,531	
Brachyury						
Negativo	47	36	2,227	1,237	4,000	0,008
Positivo	49	27	1	----	----	

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os TFSE são neoplasias agressivas e com desfechos clínicos desfavoráveis, embora tenha se observado nas últimas décadas uma sensível melhora das taxas de sobrevida. Isto é atribuído, em grande parte, à uma abordagem terapêutica mais integrada, com utilização de protocolos bem padronizados que incluem quimioterapia em todas as fases de tratamento, cirurgia e radioterapia. Entretanto, infelizmente a presença de doença localmente avançada ou metastática no diagnóstico ainda é frequentemente observada no Brasil^{14,112}. Apesar de avanços tecnológicos e do conhecimento destes tumores, ainda há muito a se fazer, especialmente com a chegada da atual era da medicina personalizada.

O profundo conhecimento clínico e molecular de cada paciente portador de TFSE será fundamental para o direcionamento de terapias alvo-específicas em um futuro próximo. O presente estudo constitui uma documentação considerável de TFSE em uma população brasileira, atestando sua diversidade clinico-patológica e apontando biomarcadores com valor prognóstico e potencial como alvos moleculares.

6.1 Caracterização geral da casuística

Neste estudo foram analisados 113 casos de TFSE. Assim como é feito rotineiramente na maioria absoluta dos laboratórios de patologia, os diagnósticos foram fundamentados na correlação das características morfológicas, imuno-histoquímicas e clínico-radiológicas. O exame de FISH,

portanto, foi utilizado como método complementar somente nos casos em que houve dúvida no diagnóstico e, embora isto possa ser considerado uma limitação científica deste estudo, acreditamos ter representado bem a realidade diagnóstica praticada nos laboratórios, especialmente brasileiros. É importante não ignorar o valor da imuno-histoquímica, considerando-se o custo-benefício desta técnica e sua disponibilidade. Além disso, é importante que os médicos estejam conscientes das limitações das técnicas de diagnóstico molecular, incluindo a não especificidade das alterações de EWSR1 e o alto custo. O exame de FISH mais utilizado para pesquisa de rearranjos do gene EWR1, que é com uma sonda do tipo "break-apart", não permite a observação do parceiro genético e, conseqüentemente, não é suficiente para excluir outras neoplasias que também têm rearranjos neste gene, como lipossarcoma mixóide, tumor desmoplásico de células redondas, condrossarcoma mixóide extraesquelético e carcinoma mioepitelial¹¹. Ademais, as outras sondas de FISH e os primers de RT-PCR comercialmente disponíveis estão limitados à apenas os transcritos de fusão mais prevalentes e, como existem outras fusões variantes nos TFSE e nos TFSE-símiles, a análise molecular auxiliar pode ser negativa, como mostraram recentemente Noujaim *et al.* (2017)¹¹³. Ainda assim, pretendemos em breve, em um estudo posterior, proceder com a análise genética de todos os casos, por meio de uma parceria com o Instituto Valenciano de Oncología, na Espanha, que incluirá, além da pesquisa das translocações mais comuns, a pesquisa de outras alterações genéticas que possam, futuramente, subclassificar ou reclassificar os tumores.

Em relação aos dados demográficos, estes foram, em sua maioria, semelhantes aos da literatura^{3,12-14,114-116}. Embora haja uma clara predileção

dos TFSE pelo sexo masculino nos estudos prévios, variando de 1,3 a 1,9 pacientes do sexo masculino para cada paciente do sexo feminino^{3,13,14,114,116}, nossa distribuição do gênero demonstrou uma proporção ainda maior de pacientes masculinos (2:1), semelhantemente aos achados de Rehki *et al.* (2013)³, o que pode meramente refletir uma particularidade demográfica inerente à população estudada.

Sabe-se que, embora mais frequentes em crianças e adolescentes, os TFSE também acometem adultos de todas as faixas etárias^{3,8,114,116,117}. A maior parte dos pacientes em nosso estudo tinham menos de 20 anos de idade (65,5%, n=74) refletindo a preponderância de indivíduos mais jovens nos TFSE, em concordância com a literatura, embora a frequência de adultos acima de 20 anos na presente população tenha sido um pouco mais elevada do que a encontrada em estudos prévios^{3,12,13,114-116}. Entretanto, muitos estudos em TFSE são realizados somente com população pediátrica ou em faixas etárias limitadas, o que impossibilita uma análise global da idade^{12-14,115}. Em nossa casuística, foram incluídos pacientes de todas as faixas etárias, sem um limite de idade inferior ou superior. O paciente mais novo tinha 2 anos de idade, enquanto o mais velho tinha 67 anos. A média de idade foi de 19 anos e mediana de 17 anos, valores semelhantes aos encontrados por outros estudos que também incluíram adultos, sem limitação da idade, como os de Bacci *et al.* (2007)¹¹⁴, Rekhi *et al.* (2013)³ e o estudo retrospectivo de Lee J *et al.* (2010)¹¹⁶ que analisaram 725 casos de TFSE através da base de dados do registro de câncer da Califórnia, EUA.

Para a pesquisa de fatores prognósticos clínicos, em uma avaliação inicial, observou-se que a idade dos pacientes teve associação com a

sobrevida global ($p = 0,003$). Pacientes com idade acima de 20 anos demonstraram sobrevida global inferior à de pacientes mais jovens, segundo a análise simples. Pela análise múltipla, entretanto, a idade não apresentou impacto na sobrevida dos pacientes de forma independente. Os dados na literatura em relação à importância da idade para o prognóstico são variados e controversos. Nossos resultados, embora não tenham definido idade como fator independente de prognóstico, são concordantes com os de outros estudos que descrevem esta associação de idade mais avançada com menores taxas de sobrevida^{15,115-117}, enfatizando-se os estudos de Karski *et al.* (2013)¹¹⁷ e Lee J *et al.* (2010)¹¹⁶ que levantaram dados de 2780 pacientes e 725 pacientes, respectivamente.

Os TFSE são reconhecidamente mais frequentes em pacientes brancos quando há uma comparação com pacientes de outras etnias, segundo dados da literatura^{13,14,118,119}. Jawad *et al.* (2009)¹¹⁸ em uma análise retrospectiva de 1631 casos provenientes da base populacional do programa SEER (Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais) do NCI (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos) mostraram que caucasianos tinham uma incidência de TFSE 9 vezes maior do que afro-americanos. No presente estudo 83% dos pacientes ($n=93$) eram brancos, corroborando os dados da literatura e apresentando números praticamente idênticos aos do primeiro estudo multicêntrico do Grupo Brasileiro para Tratamento dos TFSE, de Brunetto *et al.* (2015)¹⁴, que mostrou 82,9% de pacientes brancos em um total de 175 casos estudados.

A etnia se revelou um fator prognóstico independente em nosso estudo ($p=0,003$). Pacientes não-brancos tiveram taxas de sobrevida global inferiores às de pacientes brancos. De fato, os pacientes não-brancos

apresentaram um risco 3,4 vezes maior de óbito quando comparados a pacientes brancos (IC 95%, 1,64 - 7,03). Worch *et al.* (2010)¹¹⁹, em um amplo estudo retrospectivo de 1715 pacientes da base de dados do SEER, mostraram que a sobrevida global foi significativamente diferente de acordo com a etnia/raça dos pacientes, sendo inferior em pacientes não-brancos, em concordância com os nossos resultados. Estas diferenças nos desfechos clínicos podem refletir diferenças socioeconômicas, diferenças biológicas ou uma combinação desses fatores. Sabe-se que a realidade socioeconômica da população não-branca, especialmente negra e indígena, é extremamente desfavorável no Brasil. O baixo nível socioeconômico poderia limitar ou atrasar o acesso destes pacientes ao diagnóstico e tratamento, influenciando assim seus prognósticos. As diferenças biológicas podem incluir variações na agressividade do tumor e fatores próprios do hospedeiro, como diferenças genéticas que influenciariam no metabolismo dos tumores e na resposta ao tratamento¹¹⁹. No entanto, são necessários estudos mais amplos e concentrados na investigação destas possíveis diferenças biológicas e genéticas entre as etnias, bem como estudos adicionais sobre as disparidades no acesso à saúde para avaliar o papel destes fatores na explicação das diferenças de resultados observadas.

A caracterização da casuística também mostrou que um pouco mais da metade (50,5%) dos pacientes (n=54) apresentaram-se com doença metastática no diagnóstico. Esta frequência é substancialmente superior à descrita na literatura, que tipicamente descreve a frequência de casos com metástase no diagnóstico em torno de 25%^{1,12,13,116}. Brunetto *et. al* (2015)¹⁴ já haviam demonstrado uma proporção significativamente maior de pacientes

com doença metastática em uma população brasileira, sugerindo que esta característica poderia refletir uma associação de múltiplos fatores relacionados ao acesso e eficiência do sistema de saúde no Brasil. O Hospital de Câncer de Barretos (HCB) é um centro brasileiro de referência em câncer que atende pacientes de todos os estados brasileiros com 100% dos serviços gratuitos, contemplados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e, portanto, um viés de referência por receber casos mais avançados da doença deve ser considerado. Embora o status socioeconômico não tenha sido uma variável estudada nesta pesquisa, a possibilidade deste fator ter influenciado a frequência de casos com doença metastática no diagnóstico não pode ser afastada, como demonstraram Lee J *et. al* (2010)¹¹⁶. Muitos pacientes tratados no HCB encontram-se em níveis socioeconômicos baixos e são recebidos após já terem passado por outros centros menores e menos especializados em suas regiões, sendo admitidos após um longo atraso de diagnóstico e início de tratamento. A extensão da doença no diagnóstico é o fator prognóstico mais consistente segundo a literatura^{12-14,116,118,120}. Os resultados do presente estudo foram concordantes com os estudos prévios, observando-se sobrevida global significativamente inferior nos pacientes com doença metastática, como era esperado. A análise múltipla confirmou doença metastática no diagnóstico como um fator prognóstico independente em TFSE ($p=0,002$).

Os tumores axiais neste estudo foram ligeiramente mais frequentes do que os tumores periféricos (52,2% vs 47,8%), concordando com outros estudos encontrados na literatura^{12,116}, no entanto sem associação com prognóstico. Em relação à localização tecidual do tumor primário, 58,4% dos tumores eram ósseos e 41,6% de partes moles, dados concordantes com a literatura quanto à

supremacia dos SE ósseos^{14,114,115}, porém um pouco diferentes quanto à proporção, notando-se um número elevado de casos de SEE (n=47). Karskii *et al.* (2013)¹¹⁷, em um estudo que incluiu 2780 pacientes da base de dados do programa SEER, demonstraram que em pacientes adultos com mais de 40 anos de idade há uma maior chance de ocorrência de tumores extra-esqueléticos em comparação à pacientes mais jovens. Uma explicação plausível para a quantidade de SEE em nosso estudo seria o número considerável de adultos na série, sendo que 9 pacientes (8%)* estavam acima de 40 anos de idade no momento do diagnóstico.

Em relação ao valor prognóstico da localização tecidual dos tumores primários, a literatura apresenta resultados variados^{15,120-122}. Cash *et al.* (2016)¹⁵ e Applebaum *et al.* (2011)¹²² apresentaram resultados semelhantes, indicando melhor sobrevida global para os sarcomas de Ewing extraesqueléticos (SEE), no entanto concluíram seus estudos com opiniões divergentes. Os primeiros apóiam a prática atual de tratar estes dois subgrupos com abordagens semelhantes pois a diferença clínica é relativamente pequena, apesar dos desfechos encontrados. Ao contrário, os segundos autores defendem a tese de que os SEE são um importante subtipo dos TFSE com diferenças biológicas e que podem exigir diferentes estratégias de tratamento. Em nosso estudo, os SEE não mostraram desfechos clínicos estatisticamente diferentes dos SE ósseos, em concordância com Lee JA *et al.* (2010)¹²¹ e Orr *et al.* (2012)¹²⁰. Entretanto, ressaltamos novamente que a utilização de biomarcadores prognósticos poderia auxiliar na estratificação de risco dos pacientes e orientação para abordagens terapêuticas distintas,

* Dado complementar não incluído nos resultados

independentemente da localização tecidual da neoplasia, além de serem muito promissoras para o desenvolvimento futuro de terapias alvo-específicas.

Embora o tamanho do tumor primário seja também descrito como um importante fator prognóstico em alguns estudos encontrados na literatura^{13,116,118}, nossos resultados não mostraram associação desta variável com a sobrevida global. Este fato poderia ser explicado pelo grande número de pacientes com tumores volumosos e metástases já no momento da admissão no HCB, ou seja, já com perspectivas de prognóstico desfavorável, infelizmente. Enquanto na literatura os TFSE grandes no diagnóstico variam entre 46,2% e 60,6%^{13,116,118,120}, no presente estudo os tumores grandes corresponderam à destoante proporção de 88,5% (n=69). Tumores realmente muito grandes, como um que media 35,0cm, foram observados nesta série. Mais uma vez, um viés próprio dos centros de referência de câncer por receberem casos mais avançados, somado ao perfil socioeconômico da população tratada no HCB, o difícil acesso aos serviços regionais de saúde e o atraso no diagnóstico não podem ser excluídos para justificar esta grande frequência de tumores grandes.

6.2 Caracterização geral dos biomarcadores

O presente estudo permitiu caracterizar em conjunto a expressão de marcadores de diferentes classes biológicas nos TFSE, incluindo marcadores relacionados à supressão tumoral (MTAP, p16, p53, PTEN e RKIP), envolvidos na proliferação celular (Ciclina D1, STAG2), vias de reparo do DNA e células tronco (USP22, OCT4 e SALL4), reprogramação metabólica das células

tumorais (MCT1, MCT2, MCT4, CD147, GLUT1 e CA IX), atividade imune (PD-L1) e no processo de transição epitelial-mesenquimal (Brachyury). É importante considerar que, para a maioria destes biomarcadores, este foi o primeiro estudo que avaliou a sua expressão no contexto nacional e internacional, através de um método de alto rendimento que é o TMA.

A determinação dos pontos de corte de positividade imuno-histoquímica baseada na área sob a curva Roc permitiu definir os *scores* associados aos eventos clínicos desfavoráveis, ou seja, metástase e óbito, assim como determinar a sua sensibilidade e especificidade. Por se tratar de biomarcadores nunca antes avaliados em TFSE ou pouco explorados, estes pontos de corte podem servir como um modelo para avaliação imuno-histoquímica em futuros estudos.

As descobertas em relação às frequências de imunoexpressão dos biomarcadores podem indicar um panorama com novas possibilidades terapêuticas voltadas aos seus mecanismos biológicos. PD-L1, por exemplo, que é uma proteína com papel importante na sobrevivência das células tumorais por diminuir a resposta imune, apresentou positividade em 17,5% dos casos (n=17). Este marcador é atualmente um dos principais alvos no campo da imunoterapia, visto que anticorpos monoclonais inibidores do eixo PD1/PDL1 têm sido promissores em uma variedade de tumores como melanoma, câncer de pulmão e rim^{99,106,107}. O estudo de Lussier *et al.* (2015) demonstrou que a inibição de PD1/PD-L1 em um modelo de ratos para osteossarcoma metastático foi capaz de diminuir a carga tumoral e melhorar a sobrevivência¹²³. Os resultados encorajadores dos tratamentos com bloqueadores do eixo PD1/PD-L1 indicam que a sua utilização em sarcomas

pediátricos e outros tumores sólidos, incluindo TFSE, seja uma tendência lógica¹⁰⁹.

O biomarcador MTAP mostrou perda de expressão em 27,9% dos casos (n = 31) desta série. As pesquisas envolvendo outros tipos de câncer, como o estudo de De Oliveira *et al.* (2016) em câncer de mama, mostraram que as células tumorais com perda de MTAP, devido à deleção do gene ou à metilação do promotor de MTAP, são mais sensíveis a agentes inibidores da síntese de purinas, como metotrexate (MTX), azathioprine (AZA) e 5'-fluorouracil (5'-FU)^{39,40,42}. Este fato somado aos achados do presente estudo, especialmente a associação de MTAP com o prognóstico, que será discutida adiante, reforça a hipótese de que este biomarcador tem grande potencial terapêutico em TFSE, para futuras abordagens moleculares alvo-específicas ou como um preditor de resposta à possíveis esquemas alternativos de quimioterapia.

Em teoria, além destes citados acima, todos os marcadores que mostraram expressão aberrante em uma parcela dos tumores poderiam futuramente ser utilizados como alvos terapêuticos. Entretanto, as frequências de positividade e negatividade de cada um dos biomarcadores desta série não serão discutidas individualmente, visto que o objetivo primário deste estudo é a identificação dos biomarcadores como fator prognóstico em TFSE. Ainda assim, independentemente da relação com prognóstico, este estudo é uma documentação importante de biomarcadores em TFSE e pode significar um ponto de partida para outros estudos. Em contrapartida, há um longo caminho a ser percorrido na perspectiva da utilização prática destes marcadores como alvos terapêuticos. Entre os próximos passos neste caminho estarão estudos

para determinar se o bloqueio/estímulo de determinada via de sinalização relacionada a um biomarcador poderá melhorar a sobrevida dos pacientes. Ademais, para alguns marcadores há necessidade de uma validação dos pontos de corte da avaliação imuno-histoquímica para resposta à tratamento em séries prospectivas ou linhagens celulares.

Como perspectiva futura, está previsto um estudo *in vitro* de inibição ou estímulo em culturas celulares e um ensaio complementar em modelos *in vivo* para a maioria dos biomarcadores deste estudo. Isto poderá contribuir para a identificação daqueles que poderão ser aplicados como alvos terapêuticos em TFSE.

6.3 Associação dos biomarcadores com dados clínico-patológicos

As associações mais relevantes entre a expressão dos biomarcadores com as características clínico-patológicas foram aquelas que envolveram p53. A hiperexpressão deste biomarcador foi significativamente associada à pacientes com metástase no diagnóstico e com idade acima de 20 anos. Dos casos com doença metastática no diagnóstico, 26% eram hiperexpressos para p53 contra 8% dos casos com doença localizada. Entre os pacientes com mais de 20 anos, 27,8% apresentaram hiperexpressão de p53 contra 11,8% dos pacientes com 20 anos ou menos. Como já discutido anteriormente, metástase no diagnóstico foi um fator prognóstico independente e pacientes com mais 20 anos apresentaram sobrevida global significativamente inferior à de pacientes mais jovens. Portanto, a hiperexpressão de p53 mostrou associação com duas características clínico-patológicas que, no mínimo, foram indicadores de mau

prognóstico. A associação de p53 com o prognóstico, entretanto, será discutida adiante.

As associações com outros biomarcadores, embora tenham produzido alguns resultados significativos em termos estatísticos, não apresentaram relevância do ponto de vista clínico e seus mecanismos não foram explorados neste estudo.

6.4 Biomarcadores como fator prognóstico

Pela análise simples, as expressões dos biomarcadores MCT1, GLUT1, USP22, MTAP e p53 se correlacionaram com a sobrevida global. A positividade para MCT1 e GLUT1 e a hiperexpressão de p53 tiveram impacto negativo na sobrevida ($p=0,002$, $p=0,04$ e $p<0,001$, respectivamente), em contraste com MTAP ($p=0,028$) e USP22 ($p<0,001$), cujas perdas de expressão é que mostraram relação com sobrevidas inferiores.

MCT1 e GLUT1 fazem parte do grupo de biomarcadores relacionados ao metabolismo energético das células tumorais e têm papéis importantes nas adaptações do microambiente tumoral⁹³. Ambos agem mantendo o fenótipo glicolítico das células dos tumores sólidos, ora através do efluxo de lactato, no caso de MCT1⁸⁶, ora através do influxo de glicose, no caso de GLUT1⁹⁵. Neste estudo foi observada uma frequência de 44,8% ($n=47$) de casos positivos para MCT1 e 17,9% ($n=19$) de casos positivos para GLUT1, sugerindo que uma parcela considerável dos tumores tinham um fenótipo hiperglicolítico. Apesar de não haver outros estudos destes marcadores em TFSE, nossos achados corroboram as evidências prévias da literatura que demonstram associação

entre a expressão destas proteínas e pior prognóstico em outros tipos de câncer de fenótipo glicolítico, como câncer de mama⁹⁵, estômago⁸⁹ e sarcomas de partes moles³⁷. Esta associação pode ser explicada pelo fato do fenótipo glicolítico geralmente estar associado com características de maior agressividade tumoral⁸⁶.

USP22, considerado um dos marcadores de células-tronco em câncer, é uma subunidade do complexo SAGA, necessária para a transcrição e progressão do ciclo celular⁶⁰. A expressão positiva de USP22 tem sido associada com mau prognóstico em tipos variados de câncer como hepático⁶⁵, da tireoide⁶⁶, colorretal⁶¹ e pulmão⁶⁴. No presente estudo, entretanto, foi observada menor sobrevida nos casos com perda de expressão, o que ocorreu em 53,8% dos casos (n=56). Ou seja, neste estudo, diferentemente dos resultados em outros tumores, USP22 positivo foi um fator de proteção para os pacientes com TFSE. Isto pode refletir uma nova função desta proteína. Contudo, mesmo em tecidos normais, os mecanismos precisos para as funções e regulação de USP22 no âmbito molecular ainda não foram completamente elucidados¹²⁴. Como este é o primeiro estudo de USP22 em TFSE, é perceptível a necessidade de novos ensaios na tentativa de esclarecer estes resultados.

Na análise múltipla (Regressão de Cox), entre os biomarcadores com significância na análise simples, somente MTAP e p53 mostraram associação significativa com a sobrevida global de forma independente, além do biomarcador Brachyury.

A inativação de MTAP e a perda de sua expressão estão associadas à maior síntese *de novo* de purinas, o que resulta em maior proliferação celular

e, conseqüentemente, subtipos de tumores mais agressivos³⁹. No estudo de Su *et al.* (2014), a perda de expressão de MTAP em uma série de carcinomas do tipo "não-pequenas células" do pulmão, avaliada por imuno-histoquímica, se associou independentemente com o prognóstico³⁸. Também em linha com os nossos resultados, He *et al.* (2015) demonstraram que a deficiência de MTAP foi correlacionada com um fenótipo mais agressivo de carcinoma nasofaríngeo e com piores sobrevidas¹²⁵ e, recentemente, Nan *et al.* (2017) concluíram que a baixa expressão de MTAP foi associada à pior prognóstico em câncer de ovário¹²⁶. No presente estudo, os pacientes com perda de expressão de MTAP apresentaram um risco de óbito 1,81 vezes maior quando comparados a pacientes com a sua imunoexpressão positiva (IC 95%, 1,02 - 3,21). Com estas evidências, fica demonstrado que a perda de expressão de MTAP poderá ser útil como um preditor de pior prognóstico nos pacientes com TFSE. Ademais, isto poderá auxiliar na elaboração de uma futura estratificação de risco para estes tumores, juntamente com os outros biomarcadores e fatores clínicos associados ao prognóstico.

A respeito do biomarcador p53, embora as mutações somáticas no gene sejam observadas em até 50% de todos os tipos de câncer⁵⁵, nos TFSE elas são incomuns, como mostraram Brohl *et al.* (2014)⁵⁷ e Tirode *et al.* (2014)⁵⁶. Na presente série, foi observada hiperexpressão de p53 em 17,3% dos casos (n=18) e uma associação com pior sobrevida global, além de outros dois indicadores de pior prognóstico, como doença metastática no diagnóstico e idade acima de 20 anos. Pacientes com hiperexpressão de p53 apresentaram um risco de óbito 3,36 vezes maior do que o risco em pacientes com baixa expressão (IC 95%, 1,73 - 6,53). Estes dados corroboram os estudos

prévios^{27,56} demonstrando associação de hiperexpressão de p53 com piores prognósticos em TFSE. A hiperexpressão de p53 é o resultado do acúmulo da proteína no núcleo das células quando esta torna-se não-funcional devido às mutações no gene, que é um gene supressor tumoral. A proteína aberrante perde o efeito de supressão tumoral e, conseqüentemente, leva à instabilidade genética e à maior proliferação celular⁵⁵. Embora não haja um consenso na literatura sobre critérios para a interpretação de resultados da expressão imuno-histoquímica de p53 especificamente em TFSE, acreditamos que o uso de um ponto de corte baixo poderia dificultar a análise e subestimar a importância da expressão deste biomarcador no prognóstico. Neste estudo foi utilizado o ponto de corte 50% pois este limiar definiu mais claramente a associação de p53 com as características clinico-patológicas e prognóstico. Além de poder auxiliar na identificação dos TFSE sensíveis às futuras terapias p53-específicas, os resultados do presente estudo também indicam um subgrupo clínico de pacientes com tumores mais agressivos e, assim como MTAP e Brachyury, este biomarcador poderá fazer parte de um painel de fatores prognósticos para uma futura estratificação de risco dos pacientes.

O biomarcador Brachyury também mostrou associação significativa com a sobrevida global pela análise múltipla ($p=0,008$), indicando-o como um fator prognóstico independente. Como este marcador não apresentou significância estatística pela análise simples ($p=0,156$) e considerando-se que o modelo de regressão múltipla de Cox estimou o papel de variáveis independentes que agem multiplicativamente sobre o risco, isto sugere uma possível interação de Brachyury com p53 e MTAP, os outros dois biomarcadores com impacto no prognóstico. Contudo, para elucidar esta possível associação biológica entre

Brachyury e os outros dois marcadores em TFSE, são necessários estudos mais específicos.

Na maioria das publicações prévias, a expressão positiva de Brachyury, um fator de transcrição normalmente expresso na notocorda e em cordomas, se associou com piores prognósticos em tipos variados de câncer⁸²⁻⁸⁵. Palena *et al.* (2014) demonstraram que a expressão de Brachyury foi associada com maior risco de recorrência e metástase em câncer de mama⁸³. Os resultados prévios do nosso grupo de estudos (Pinto *et al.*, 2016), em uma análise de GISTs, também seguiram esta linha, indicando que a expressão positiva de Brachyury foi um fator prognóstico independente nestes tumores⁸⁵. No entanto, diferentemente das publicações anteriores, o presente estudo demonstrou associação da perda de expressão da proteína com pior sobrevida global. De fato, neste estudo, a expressão negativa de Brachyury conferiu um risco de óbito 2,22 vezes maior que o risco em pacientes com sua expressão positiva (IC 95%, 1,23 - 4,00).

Uma das possíveis explicações para esta divergência com a literatura seria a definição de expressão positiva utilizada em outros estudos, mais especificamente, a sublocalização celular da marcação. Nestas publicações^{82,85}, os autores interpretaram como positividade a expressão citoplasmática juntamente com a expressão nuclear. Entretanto, Miettinen *et al.* (2015), em uma análise extensa de 5229 tumores variados, mostraram que a expressão nuclear de Brachyury para o diagnóstico de cordoma em frente aos seus diagnósticos diferenciais foi altamente específica, enquanto a expressão citoplasmática pôde ser observada em uma variedade maior de tumores⁸⁰. No presente estudo, os controles positivos utilizados foram justamente amostras

de cordomas e, baseando-se na experiência com estes tumores e no fato de se tratar de um fator de transcrição nuclear, compartilhamos a percepção de que a expressão de Brachyury é mais fidedigna no núcleo, podendo ser aplicada por analogia também para outros tumores.

Outro fato relevante a ser considerado é que o papel de Brachyury na biologia das células dos TFSE ainda não foi explorado. A perda de expressão associada a pior prognóstico sugere que possa haver uma função de supressão tumoral desta proteína nos TFSE. O papel mais conhecido de Brachyury é na condução da transição epitelial-mesenquimal, levando à maior agressividade das células, especialmente carcinomas⁸¹. Entretanto, há novas evidências importantes em relação às funções de Brachyury. Pinto (2016) demonstrou que Brachyury mostrou-se significativamente hipoexpresso nos gliomas comparados aos tecidos normais do cérebro e a diminuição de sua expressão foi associada à maior agressividade tumoral e pior prognóstico¹²⁷. Com ensaios *in vitro* e *in vivo*, foi observado que as células de glioma positivas para Brachyury apresentaram reduzida viabilidade celular, devido ao aumento da apoptose e autofagia e, portanto, Brachyury agiu como um supressor tumoral nestes tumores. Estes achados são encorajadores para estudos semelhantes em TFSE e nos permitem pressupor a existência de um papel de supressão tumoral a ser explorado. Assim, é possível vislumbrar a utilização de Brachyury, não só como um biomarcador de prognóstico em TFSE, mas também como um alvo terapêutico alternativo aos tratamentos convencionais.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- A população estudada apresentou uma taxa elevada de tumores grandes e com metástases no diagnóstico.
- Entre as características clínico-patológicas, metástase no diagnóstico e etnia não-branca tiveram impacto independente no prognóstico.
- Pacientes com metástase no diagnóstico ou idade acima de 20 anos mostraram uma associação significativa com hiperexpressão de p53.
- A hiperexpressão de p53 e a perda de expressão de MTAP e Brachyury foram identificados como fatores independentes de pior prognóstico.

ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo A - Ficha de coleta para dados clínico-demográficos

Projeto: Pesquisa de novos biomarcadores em tumores da família Ewing ósseos e extra-ósseos			
Lucas Faria Abrahão Machado			
Dados sociodemográficos			
1	ID		1
2	Nome		2
3	RH		3
4	Sexo	1- Feminino; 2- Masculino	4
5	Data de nascimento	DD/MM/AAAA	5
6	Raça	1- Branco; 2- Negro; 3- Pardo; 4- Amarelo; 99- Ignorado	6
7	Cidade de procedência	Descrever; 99- Ignorado	7
9	Estado de procedência	Descrever; 99- Ignorado	9
Diagnóstico			
10	Data do diagnóstico (anatomopatológico ou imagem, o mais cedo)	DD/MM/AAAA	10
11	Biópsia	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	11
12	Número do AP	E _____; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	12
13	Data da primeira biópsia	DD/MM/AAAA	13
14	Tamanho do tumor antes do tratamento (por exame de imagem) – MAIOR EIXO	Em cm; 99- Ignorado	14
15	Local do tumor (origem)	1- Osso; 2- Partes moles; 99- Ignorado	15
16	Se ósseo, qual osso?	1- Fêmur; 2- Tibia; 3- Úmero; 4- Fíbula; 5- Crânio; 6- Pelve; 7- Outro; 99- Ignorado	16
17	Se outro osso não descrito, qual?	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	17
18	Se partes moles, qual local?	1- Coxa; 2- Perna; 3- Braço; 4- Antebraço; 5- Tronco; 6- Cabeça e pescoço; 7- Retroperitônio; 8- Outros; 99- Ignorado	18
19	Se outro local não descrito, qual?	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	19
20	Metástase ao diagnóstico	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	20
21	Local da metástase ao diagnóstico - Pulmão	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	21
22	Local da metástase ao diagnóstico - Ossos	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	22
23	Local da metástase ao diagnóstico - Medula Ossea	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	23
24	Local da metástase ao diagnóstico - SNC	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	24
25	Local da metástase ao diagnóstico - Fígado	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	25
26	Local da metástase ao diagnóstico – Outro local	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	26
27	Se outro local, descrever:	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	27
28	Estadiamento clínico	1- IA; 2- IB; 3- IIA; 4- IIB; 5- III; 6- IVA; 7- IVB; 99- Ignorado	28
Tratamento			
29	Data do primeiro atendimento em nosso serviço	DD/MM/AAAA	29
30	Data em que recebeu o primeiro tratamento	DD/MM/AAAA	30
31	Realizou qualquer tratamento quimioterápico?	0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	31
32	Quimioterapia neoadjuvante	0- Não; 1- Sim; 88- 99- Ignorado	32
33	Quimioterapia adjuvante	0- Não; 1- Sim; 88 99- Ignorado	33

continua

Anexo A - Ficha de coleta para dados clínico-demográficos (continuação)

34	Quimioterapia terapia exclusiva 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	34	
35	Radioterapia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	35	
36	Cirurgia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	36	
37	Data da cirurgia DD/MM/AAAA	37	__/__/____
38	E cirurgia (número AP) Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	38	
38	Tipo de ressecção 1- Com preservação do membro; 2- Sem preservação do membro (amputação); 88- Não se aplica; 99- Ignorado	38	
39	Margem cirúrgica 0- Livre; 1- Comprometida; 99- Ignorado	39	
40	Huvos 1- Grau 1; 2- Grau 2; 3- Grau 3; 4- Grau 4; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	40	
41	Tamanho do tumor (macroscopia) – MAIOR EIXO Em cm; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	41	
Pós-tratamento			
42	Recidiva (após tratamento, ressurgimento da neoplasia local ou à distância) 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	42	
43	Recidiva local 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	43	
44	Data da recidiva local DD/MM/AAAA	44	__/__/____
45	Metástase após o diagnóstico 0- Ausentes; 1- Presentes; 99- Ignorado	45	
46	Data da metástase após o diagnóstico DD/MM/AAAA	46	__/__/____
47	Local da metástase após o diagnóstico - Pulmão 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	47	
48	Local da metástase após o diagnóstico - Ossos 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	48	
49	Local da metástase após o diagnóstico - Medula Ossea 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	49	
50	Local da metástase após o diagnóstico - SNC 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	50	
51	Local da metástase após o diagnóstico - Fígado 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	51	
52	Local da metástase após o diagnóstico – Outro local 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	52	
53	Se outro local, descrever: Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	53	
54	Data da última informação / óbito DD/MM/AAAA	54	__/__/____
55	Status 1- Vivo sem doença; 2- Vivo com doença; 3- Óbito por câncer; 4- Óbito por outras causas; 5- Perda de seguimento	55	
56	OBS.:	56	

Anexo B - Parecer consubstanciado do CEP elaborado pelo Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

<p>FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FMUSP</p> 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
Título da Pesquisa: Pesquisa de novos biomarcadores em tumores da família Ewing ósseos e extra-ósseos								
Pesquisador: OLAVO PIRES DE CAMARGO								
Área Temática:								
Versão: 1								
CAAE: 42788015.5.0000.0065								
Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo								
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 1.019.239								
Data da Relatoria: 18/03/2015								
Apresentação do Projeto:								
Trata-se de projeto de doutorado do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP, tem como objetivo identificar novos biomarcadores para melhor estratificar a evolução dos pacientes com Tumor da Família Ewing (neoplasia de células neuroectodérmicas de comportamento agressivo) e também melhorias nos resultados terapêuticos que hoje ainda se mostram pouco eficientes. As amostras utilizadas neste estudo serão disponibilizadas pelo Departamento de Patologia do Hospital do Câncer de Barretos.								
Objetivo da Pesquisa:								
Avaliar a expressão de 22 anticorpos por imunistoquímica e investigar seu valor prognóstico e preditivo como biomarcadores em tumores da família Ewing.								
Avaliação dos Riscos e Benefícios:								
O projeto não envolve risco na medida em que utilizará amostras previamente armazenadas. Os benefícios deste projeto serão representados pela melhoria nos resultados terapêuticos para os pacientes portadores dessa doença.								
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:								
A identificação de novos marcadores nesta pesquisa, pode trazer benefícios ao diagnóstico e resposta ao tratamento do tumor da família Ewing.								
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36</td> <td style="border: none;">CEP: 01.248-903</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Bairro: PACAEMBU</td> <td style="border: none;">Município: SAO PAULO</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">UF: SP</td> <td style="border: none;">Telefone: (11)3893-4401</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">E-mail: cep.fm@usp.br</td> <td></td> </tr> </table>	Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	CEP: 01.248-903	Bairro: PACAEMBU	Município: SAO PAULO	UF: SP	Telefone: (11)3893-4401	E-mail: cep.fm@usp.br	
Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36	CEP: 01.248-903							
Bairro: PACAEMBU	Município: SAO PAULO							
UF: SP	Telefone: (11)3893-4401							
E-mail: cep.fm@usp.br								

continua

Anexo B - Parecer consubstanciado do CEP elaborado pelo Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (continuação)

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 1.019.239

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Considerando que o material utilizado neste estudo será proveniente de banco de tumores, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido não se aplica neste caso.

Recomendações:

Sem recomendação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram identificados no projeto inadequações éticas estando o projeto aderente aos termos da Resolução CNS 196/96 e 441.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 10 de Abril de 2015

Assinado por:
Roger Chammas
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 38
Bairro: PACAEMBU CEP: 01.248-903
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

Anexo C - Parecer consubstanciado do CEP elaborado pelo Hospital de Câncer de Barretos

	FUNDAÇÃO PIO XII - HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS									
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP										
Elaborado pela Instituição Coparticipante										
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA										
Título da Pesquisa: Pesquisa de novos biomarcadores em tumores da família Ewing ósseos e extra-ósseos										
Pesquisador: OLAVO PIRES DE CAMARGO										
Área Temática:										
Versão: 1										
CAAE: 42788015.5.3001.5437										
Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo										
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio										
DADOS DO PARECER										
Número do Parecer: 1.033.314										
Data da Relatoria: 23/04/2015										
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:										
Não existem pendências e/ou inadequações.										
Situação do Parecer:										
Aprovado										
Necessita Apreciação da CONEP:										
Não										
Considerações Finais a critério do CEP:										
O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta -se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.										
Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:										
<ol style="list-style-type: none"> 1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 22/10/2015. 2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. 3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo. 4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do 										
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331</td> <td>CEP: 14.784-400</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Dr. Paulo Prata</td> <td>Município: BARRETOS</td> </tr> <tr> <td>UF: SP</td> <td>Telefone: (17)3321-0347</td> </tr> <tr> <td>Fax: (17)3321-8600</td> <td>E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br</td> </tr> </table>			Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	CEP: 14.784-400	Bairro: Dr. Paulo Prata	Município: BARRETOS	UF: SP	Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-8600	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br
Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	CEP: 14.784-400									
Bairro: Dr. Paulo Prata	Município: BARRETOS									
UF: SP	Telefone: (17)3321-0347									
Fax: (17)3321-8600	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br									

continua

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1. De Alava E, Lessnick SL, Sorensen PH. Ewing Sarcoma. In: Fletcher DM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F, editors. *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. Lyon: IARC; 2013.
2. Llombart-Bosch A, Machado I, Navarro S, Bertoni F, Bacchini P, Alberghini M, et al. Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2009 Nov;455(5):397-411. PubMed PMID: 19841938.
3. Rekhi B, Vogel U, Basak R, Desai SB, Jambhekar NA. Clinicopathological and molecular spectrum of ewing sarcomas/PNETs, including validation of EWSR1 rearrangement by conventional and array FISH technique in certain cases. *Pathology oncology research : POR*. 2014 Jul;20(3):503-16. PubMed PMID: 24293381.
4. Wei S, Siegal GP. Round cell tumors of bone: an update on recent molecular genetic advances. *Advances in anatomic pathology*. 2014 Sep;21(5):359-72. PubMed PMID: 25105937.
5. Kim SK, Park YK. Ewing sarcoma: a chronicle of molecular pathogenesis. *Human pathology*. 2016 Sep;55:91-100. PubMed PMID: 27246176.
6. Fletcher CD. The evolving classification of soft tissue tumours - an update based on the new 2013 WHO classification. *Histopathology*. 2014 Jan;64(1):2-11. PubMed PMID: 24164390.
7. Ewing J. Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. James Ewing. *Proceedings of the New York Pathological Society*, 1921. CA: a cancer journal for clinicians. 1972 Mar-Apr;22(2):95-8. PubMed PMID: 4622125.
8. Unni KK, American Registry of Pathology., Armed Forces Institute of Pathology (U.S.). *Tumors of the bones and joints*. Washington, DC: American Registry of Pathology in collaboration with the Armed Forces Institute of Pathology; 2005. xiii, 399 p. p.
9. Gordon DJ, Motwani M, Pellman D. Modeling the initiation of Ewing sarcoma tumorigenesis in differentiating human embryonic stem cells. *Oncogene*. 2016 Jun 16;35(24):3092-102. PubMed PMID: 26455317. Pubmed Central PMCID: 4829493.
10. von Levetzow C, Jiang X, Gwee Y, von Levetzow G, Hung L, Cooper A, et al. Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells. *PloS one*. 2011;6(4):e19305. PubMed PMID: 21559395. Pubmed Central PMCID: 3084816.
11. Machado I, Navarro S, Llombart-Bosch A. Ewing sarcoma and the new emerging Ewing-like sarcomas: (CIC and BCOR-rearranged-sarcomas). A systematic review. *Histology and histopathology*. 2016 Jun 16:11792. PubMed PMID: 27306060.
12. Hamilton SN, Carlson R, Hasan H, Rassekh SR, Goddard K. Long-term Outcomes and Complications in Pediatric Ewing Sarcoma. *American journal of clinical oncology*. 2015 Jan 16. PubMed PMID: 25599318.

- 13.** Rodriguez-Galindo C, Liu T, Krasin MJ, Wu J, Billups CA, Daw NC, et al. Analysis of prognostic factors in ewing sarcoma family of tumors: review of St. Jude Children's Research Hospital studies. *Cancer*. 2007 Jul 15;110(2):375-84. PubMed PMID: 17569105.
- 14.** Brunetto AL, Castillo LA, Petrilli AS, Macedo CD, Boldrini E, Costa C, et al. Carboplatin in the treatment of Ewing sarcoma: Results of the first Brazilian collaborative study group for Ewing sarcoma family tumors-EWING1. *Pediatric blood & cancer*. 2015 Oct;62(10):1747-53. PubMed PMID: 25917418.
- 15.** Cash T, McIlvaine E, Krailo MD, Lessnick SL, Lawlor ER, Laack N, et al. Comparison of clinical features and outcomes in patients with extraskelatal versus skeletal localized Ewing sarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatric blood & cancer*. 2016 Jun 14. PubMed PMID: 27297500.
- 16.** De Gruttola VG, Clax P, DeMets DL, Downing GJ, Ellenberg SS, Friedman L, et al. Considerations in the evaluation of surrogate endpoints in clinical trials. summary of a National Institutes of Health workshop. *Controlled clinical trials*. 2001 Oct;22(5):485-502. PubMed PMID: 11578783. Epub 2001/10/02. eng.
- 17.** Hodgson DR, Whittaker RD, Herath A, Amakye D, Clack G. Biomarkers in oncology drug development. *Molecular oncology*. 2009 Feb;3(1):24-32. PubMed PMID: 19383364.
- 18.** Shukla N, Schiffman J, Reed D, Davis IJ, Womer RB, Lessnick SL, et al. Biomarkers in Ewing Sarcoma: The Promise and Challenge of Personalized Medicine. A Report from the Children's Oncology Group. *Frontiers in oncology*. 2013;3:141. PubMed PMID: 23761859. Pubmed Central PMCID: 3674398.
- 19.** Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Silvestrini A. Cancer Biomarkers Discovery and Validation: State of the Art, Problems and Future Perspectives. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;867:9-26. PubMed PMID: 26530357. Epub 2015/11/05. eng.
- 20.** Zhu YY, Si W, Ji TF, Guo XQ, Hu Y, Yang JL. The variation and clinical significance of hormone receptors and Her-2 status from primary to metastatic lesions in breast cancer patients. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016 Jun;37(6):7675-84. PubMed PMID: 26687919. Epub 2015/12/22. eng.
- 21.** Rossi G, Ragazzi M, Tamagnini I, Mengoli MC, Vincenzi G, Barbieri F, et al. Does Immunohistochemistry Represent a Robust Alternative Technique in Determining Drugable Predictive Gene Alterations in Non-Small Cell Lung Cancer? *Current drug targets*. 2017;18(1):13-26. PubMed PMID: 25901525. Epub 2015/04/23. eng.
- 22.** Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003 Dec 01;21(23):4342-9. PubMed PMID: 14645423. Epub 2003/12/04. eng.
- 23.** Langendijk JA, Psyrri A. The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and

future clinical studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010 Oct;21(10):1931-4. PubMed PMID: 20716626. Epub 2010/08/19. eng.

24. van Maldegem AM, Hogendoorn PC, Hassan AB. The clinical use of biomarkers as prognostic factors in Ewing sarcoma. *Clinical sarcoma research*. 2012;2(1):7. PubMed PMID: 22587879. Pubmed Central PMCID: 3351700.

25. Kovar H, Jug G, Aryee DN, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, et al. Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene*. 1997 Oct;15(18):2225-32. PubMed PMID: 9393981. Epub 1997/12/11. eng.

26. Honoki K, Stojanovski E, McEvoy M, Fujii H, Tsujiuchi T, Kido A, et al. Prognostic significance of p16 INK4a alteration for Ewing sarcoma: a meta-analysis. *Cancer*. 2007 Sep 15;110(6):1351-60. PubMed PMID: 17661343. Epub 2007/07/31. eng.

27. de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, et al. Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer*. 2000 Aug 15;89(4):783-92. PubMed PMID: 10951341.

28. Fuchs B, Inwards CY, Janknecht R. Vascular endothelial growth factor expression is up-regulated by EWS-ETS oncoproteins and Sp1 and may represent an independent predictor of survival in Ewing's sarcoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004 Feb 15;10(4):1344-53. PubMed PMID: 14977835.

29. Perbal B, Lazar N, Zambelli D, Lopez-Guerrero JA, Llombart-Bosch A, Scotlandi K, et al. Prognostic relevance of CCN3 in Ewing sarcoma. *Human pathology*. 2009 Oct;40(10):1479-86. PubMed PMID: 19695675. Epub 2009/08/22. eng.

30. Cash T, Yin H, McCracken C, Geng Z, DuBois SG, Shehata BM, et al. Correlation of Ezrin Expression Pattern and Clinical Outcomes in Ewing Sarcoma. *Sarcoma*. 2017;2017:8758623. PubMed PMID: 28246524. Pubmed Central PMCID: PMC5299201 publication of this paper. Epub 2017/03/02. eng.

31. Casimiro MC, Velasco-Velazquez M, Aguirre-Alvarado C, Pestell RG. Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present. *Expert opinion on investigational drugs*. 2014 Mar;23(3):295-304. PubMed PMID: 24387133.

32. Dai W, Yao Y, Zhou Q, Sun CF. Ubiquitin-specific peptidase 22, a histone deubiquitinating enzyme, is a novel poor prognostic factor for salivary adenoid cystic carcinoma. *PLoS one*. 2014;9(1):e87148. PubMed PMID: 24466336. Pubmed Central PMCID: 3900714.

33. Evers L, Perez-Mancera PA, Lenkiewicz E, Tang N, Aust D, Knosel T, et al. STAG2 is a clinically relevant tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genome medicine*. 2014;6(1):9. PubMed PMID: 24484537. Pubmed Central PMCID: 3971348.

34. He W, Li K, Wang F, Qin YR, Fan QX. Expression of OCT4 in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. *World*

journal of gastroenterology : WJG. 2012 Feb 21;18(7):712-9. PubMed PMID: 22363145. Pubmed Central PMCID: 3281231.

35. Knosel T, Altendorf-Hofmann A, Lindner L, Issels R, Hermeking H, Schuebbe G, et al. Loss of p16(INK4a) is associated with reduced patient survival in soft tissue tumours, and indicates a senescence barrier. *Journal of clinical pathology*. 2014 Jul;67(7):592-8. PubMed PMID: 24747207.

36. Li J, Wang Z, Li Y. USP22 nuclear expression is significantly associated with progression and unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2012 Aug;138(8):1291-7. PubMed PMID: 22447106.

37. Pinheiro C, Penna V, Morais-Santos F, Abrahao-Machado LF, Ribeiro G, Curcelli EC, et al. Characterization of monocarboxylate transporters (MCTs) expression in soft tissue sarcomas: distinct prognostic impact of MCT1 sub-cellular localization. *Journal of translational medicine*. 2014;12:118. PubMed PMID: 24885736. Pubmed Central PMCID: 4036386.

38. Su CY, Chang YC, Chan YC, Lin TC, Huang MS, Yang CJ, et al. MTAP is an independent prognosis marker and the concordant loss of MTAP and p16 expression predicts short survival in non-small cell lung cancer patients. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2014 Sep;40(9):1143-50. PubMed PMID: 24969958.

39. de Oliveira SF, Ganzinelli M, Chila R, Serino L, Maciel ME, Urban Cde A, et al. Characterization of MTAP Gene Expression in Breast Cancer Patients and Cell Lines. *PloS one*. 2016;11(1):e0145647. PubMed PMID: 26751376. Pubmed Central PMCID: 4709099.

40. Bertino JR, Waud WR, Parker WB, Lubin M. Targeting tumors that lack methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) activity: current strategies. *Cancer biology & therapy*. 2011 Apr 1;11(7):627-32. PubMed PMID: 21301207. Pubmed Central PMCID: 3084968.

41. Becker AP, Scapulatempo-Neto C, Menezes WP, Clara C, Machado HR, Oliveira RS, et al. Expression of Methylthioadenosine Phosphorylase (MTAP) in Pilocytic Astrocytomas. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2015;82(2):84-9. PubMed PMID: 26088413.

42. Lubin M, Lubin A. Selective killing of tumors deficient in methylthioadenosine phosphorylase: a novel strategy. *PloS one*. 2009 May 29;4(5):e5735. PubMed PMID: 19478948. Pubmed Central PMCID: 2684647.

43. Liggett WH, Jr., Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998 Mar;16(3):1197-206. PubMed PMID: 9508208.

44. Lerman DM, Monument MJ, McIlvaine E, Liu XQ, Huang D, Monovich L, et al. Tumoral TP53 and/or CDKN2A alterations are not reliable prognostic biomarkers in patients with localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatric blood & cancer*. 2015 May;62(5):759-65. PubMed PMID: 25464386. Pubmed Central PMCID: PMC4376595. Epub 2014/12/03. eng.

45. Li Y, Wei J, Xu C, Zhao Z, You T. Prognostic significance of cyclin D1 expression in colorectal cancer: a meta-analysis of observational studies. *PLoS one*. 2014;9(4):e94508. PubMed PMID: 24728073. Pubmed Central PMCID: 3984178.
46. Fagone P, Nicoletti F, Salvatorelli L, Musumeci G, Magro G. Cyclin D1 and Ewing's sarcoma/PNET: A microarray analysis. *Acta histochemica*. 2015 Oct;117(8):824-8. PubMed PMID: 26363896.
47. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012 Apr 04;13(5):283-96. PubMed PMID: 22473468. Epub 2012/04/05. Eng.
48. Li L, Ross AH. Why is PTEN an important tumor suppressor? *Journal of cellular biochemistry*. 2007 Dec 15;102(6):1368-74. PubMed PMID: 17972252. Epub 2007/11/01. Eng.
49. Guijarro MV, Dahiya S, Danielson LS, Segura MF, Vales-Lara FM, Menendez S, et al. Dual Pten/Tp53 suppression promotes sarcoma progression by activating Notch signaling. *The American journal of pathology*. 2013 Jun;182(6):2015-27. PubMed PMID: 23708211. Pubmed Central PMCID: PMC3668021. Epub 2013/05/28. Eng.
50. Bucheit AD, Chen G, Siroy A, Tetzlaff M, Broaddus R, Milton D, et al. Complete loss of PTEN protein expression correlates with shorter time to brain metastasis and survival in stage IIIB/C melanoma patients with BRAFV600 mutations. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014 Nov 1;20(21):5527-36. PubMed PMID: 25165098. Pubmed Central PMCID: PMC4216767. Epub 2014/08/29. Eng.
51. Niemeyer BF, Parrish JK, Spoelstra NS, Joyal T, Richer JK, Jedlicka P. Variable expression of PIK3R3 and PTEN in Ewing Sarcoma impacts oncogenic phenotypes. *PLoS one*. 2015;10(1):e0116895. PubMed PMID: 25603314. Pubmed Central PMCID: PMC4300218. Epub 2015/01/21. Eng.
52. Xiao J, Hu CP, He BX, Chen X, Lu XX, Xie MX, et al. PTEN expression is a prognostic marker for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Oncotarget*. 2016 Aug 5. PubMed PMID: 27506936. Epub 2016/08/11. Eng.
53. Yang ZY, Yu YY, Yuan JQ, Shen WX, Zheng DY, Chen JZ, et al. The prognostic value of phosphatase and tensin homolog negativity in breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 32 studies with 4393 patients. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016 May;101:40-9. PubMed PMID: 26951995. Epub 2016/03/10. Eng.
54. Neilsen PM, Pishas KI, Callen DF, Thomas DM. Targeting the p53 Pathway in Ewing Sarcoma. *Sarcoma*. 2011;2011:746939. PubMed PMID: 21197471. Pubmed Central PMCID: 3005944.
55. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009 May 01;137(3):413-31. PubMed PMID: 19410540.
56. Tirode F, Surdez D, Ma X, Parker M, Le Deley MC, Bahrami A, et al. Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of

STAG2 and TP53 mutations. *Cancer discovery*. 2014 Nov;4(11):1342-53. PubMed PMID: 25223734. Pubmed Central PMCID: PMC4264969. Epub 2014/09/17. eng.

57. Brohl AS, Solomon DA, Chang W, Wang J, Song Y, Sindiri S, et al. The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS genetics*. 2014 Jul;10(7):e1004475. PubMed PMID: 25010205. Pubmed Central PMCID: 4091782.

58. Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahloun AG, Harris BT, et al. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. *Science*. 2011 Aug 19;333(6045):1039-43. PubMed PMID: 21852505. Pubmed Central PMCID: 3374335.

59. Shen CH, Kim SH, Trousil S, Frederick DT, Piris A, Yuan P, et al. Loss of cohesin complex components STAG2 or STAG3 confers resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Nature medicine*. 2016 Sep;22(9):1056-61. PubMed PMID: 27500726. Pubmed Central PMCID: PMC5014622. Epub 2016/08/09. eng.

60. Zhang XY, Varthi M, Sykes SM, Phillips C, Warzecha C, Zhu W, et al. The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression. *Molecular cell*. 2008 Jan 18;29(1):102-11. PubMed PMID: 18206973. Pubmed Central PMCID: 2254522.

61. Liu YL, Jiang SX, Yang YM, Xu H, Liu JL, Wang XS. USP22 acts as an oncogene by the activation of BMI-1-mediated INK4a/ARF pathway and Akt pathway. *Cell biochemistry and biophysics*. 2012 Jan;62(1):229-35. PubMed PMID: 21928107.

62. Sussman RT, Stanek TJ, Estes P, Gearhart JD, Knudsen KE, McMahon SB. The epigenetic modifier ubiquitin-specific protease 22 (USP22) regulates embryonic stem cell differentiation via transcriptional repression of sex-determining region Y-box 2 (SOX2). *The Journal of biological chemistry*. 2013 Aug 16;288(33):24234-46. PubMed PMID: 23760504. Pubmed Central PMCID: 3745368.

63. Schrecengost RS, Dean JL, Goodwin JF, Schiewer MJ, Urban MW, Stanek TJ, et al. USP22 regulates oncogenic signaling pathways to drive lethal cancer progression. *Cancer research*. 2014 Jan 1;74(1):272-86. PubMed PMID: 24197134. Pubmed Central PMCID: 3947329.

64. Ning J, Zhang J, Liu W, Lang Y, Xue Y, Xu S. Overexpression of ubiquitin-specific protease 22 predicts poor survival in patients with early-stage non-small cell lung cancer. *European journal of histochemistry : EJH*. 2012;56(4):e46. PubMed PMID: 23361242. Pubmed Central PMCID: 3567765.

65. Tang B, Tang F, Li B, Yuan S, Xu Q, Tomlinson S, et al. High USP22 expression indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015 May 20;6(14):12654-67. PubMed PMID: 25909224. Pubmed Central PMCID: 4494964.

66. Zhao HD, Tang HL, Liu NN, Zhao YL, Liu QQ, Zhu XS, et al. Targeting ubiquitin-specific protease 22 suppresses growth and metastasis of anaplastic thyroid carcinoma. *Oncotarget*. 2016 May 24;7(21):31191-203. PubMed PMID: 27145278.

67. Samardzija C, Quinn M, Findlay JK, Ahmed N. Attributes of Oct4 in stem cell biology: perspectives on cancer stem cells of the ovary. *Journal of ovarian research*. 2012;5(1):37. PubMed PMID: 23171809. Pubmed Central PMCID: 3536609.

- 68.** Thomson M, Liu SJ, Zou LN, Smith Z, Meissner A, Ramanathan S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell*. 2011 Jun 10;145(6):875-89. PubMed PMID: 21663792.
- 69.** Li X, Wang J, Xu Z, Ahmad A, Li E, Wang Y, et al. Expression of sox2 and oct4 and their clinical significance in human non-small-cell lung cancer. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(6):7663-75. PubMed PMID: 22837720. Pubmed Central PMCID: 3397552.
- 70.** Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. *Chinese journal of cancer*. 2013 Sep;32(9):483-7. PubMed PMID: 23419197. Pubmed Central PMCID: 3845564.
- 71.** Suva ML, Riggi N, Stehle JC, Baumer K, Tercier S, Joseph JM, et al. Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma. *Cancer research*. 2009 Mar 1;69(5):1776-81. PubMed PMID: 19208848.
- 72.** Tatetsu H, Kong NR, Chong G, Amabile G, Tenen DG, Chai L. SALL4, the missing link between stem cells, development and cancer. *Gene*. 2016 Jun 15;584(2):111-9. PubMed PMID: 26892498. Pubmed Central PMCID: 4823161.
- 73.** Dirican E, Akkiprik M. Functional and clinical significance of SALL4 in breast cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016 Sep;37(9):11701-9. PubMed PMID: 27444278.
- 74.** Zhou S, Venkatramani R, Gomulia E, Shillingford N, Wang L. The diagnostic and prognostic value of SALL4 in hepatoblastoma. *Histopathology*. 2016 Nov;69(5):822-30. PubMed PMID: 27252091.
- 75.** He J, Zhou M, Chen X, Yue D, Yang L, Qin G, et al. Inhibition of SALL4 reduces tumorigenicity involving epithelial-mesenchymal transition via Wnt/beta-catenin pathway in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2016 Jun 21;35(1):98. PubMed PMID: 27329034. Pubmed Central PMCID: 4915037.
- 76.** Cheng J, Gao J, Shuai X, Tao K. Oncogenic protein SALL4 and ZNF217 as prognostic indicators in solid cancers: a metaanalysis of individual studies. *Oncotarget*. 2016 Apr 26;7(17):24314-25. PubMed PMID: 27007163. Pubmed Central PMCID: 5029703.
- 77.** Martinho O, Granja S, Jaraquemada T, Caeiro C, Miranda-Goncalves V, Honavar M, et al. Downregulation of RKIP is associated with poor outcome and malignant progression in gliomas. *PloS one*. 2012;7(1):e30769. PubMed PMID: 22292035. Pubmed Central PMCID: 3264629.
- 78.** Martinho O, Campos M, Ribeiro G, Penna V, Curcelli EC, Olivieri MV, et al. Raf Kinase Inhibitor Protein Expression and Prognostic Value in Soft Tissue Sarcomas. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2016;83(1):41-6. PubMed PMID: 26859895.

- 79.** Lamiman K, Keller JM, Mizokami A, Zhang J, Keller ET. Survey of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in multiple cancer types. *Critical reviews in oncogenesis*. 2014;19(6):455-68. PubMed PMID: 25597355.
- 80.** Miettinen M, Wang Z, Lasota J, Heery C, Schlom J, Palena C. Nuclear Brachyury Expression Is Consistent in Chordoma, Common in Germ Cell Tumors and Small Cell Carcinomas, and Rare in Other Carcinomas and Sarcomas: An Immunohistochemical Study of 5229 Cases. *The American journal of surgical pathology*. 2015 Oct;39(10):1305-12. PubMed PMID: 26099010. Pubmed Central PMCID: 4567944.
- 81.** Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J, Palena C. The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. *The Journal of clinical investigation*. 2010 Feb;120(2):533-44. PubMed PMID: 20071775. Pubmed Central PMCID: 2810072.
- 82.** Haro A, Yano T, Kohno M, Yoshida T, Koga T, Okamoto T, et al. Expression of Brachyury gene is a significant prognostic factor for primary lung carcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2013 Dec;20 Suppl 3:S509-16. PubMed PMID: 23456319.
- 83.** Palena C, Roselli M, Litzinger MT, Ferroni P, Costarelli L, Spila A, et al. Overexpression of the EMT driver brachyury in breast carcinomas: association with poor prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014 May 09;106(5). PubMed PMID: 24815864. Pubmed Central PMCID: 4568990.
- 84.** Pinto F, Pertega-Gomes N, Pereira MS, Vizcaino JR, Monteiro P, Henrique RM, et al. T-box transcription factor brachyury is associated with prostate cancer progression and aggressiveness. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014 Sep 15;20(18):4949-61. PubMed PMID: 25009296.
- 85.** Pinto F, Campanella NC, Abrahao-Machado LF, Scapulatempo-Neto C, de Oliveira AT, Brito MJ, et al. The embryonic Brachyury transcription factor is a novel biomarker of GIST aggressiveness and poor survival. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2016 Apr;19(2):651-9. PubMed PMID: 25995035.
- 86.** Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, Baltazar F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2012 Feb;44(1):127-39. PubMed PMID: 22407107.
- 87.** Halestrap AP. The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Molecular aspects of medicine*. 2013 Apr-Jun;34(2-3):337-49. PubMed PMID: 23506875.
- 88.** Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. PubMed PMID: 21376230.
- 89.** Pinheiro C, Longatto-Filho A, Simoes K, Jacob CE, Bresciani CJ, Zilberstein B, et al. The prognostic value of CD147/EMMPRIN is associated with monocarboxylate transporter 1 co-expression in gastric cancer. *European journal of cancer*. 2009 Sep;45(13):2418-24. PubMed PMID: 19628385.
- 90.** Ladanyi M, Antonescu CR, Drobnjak M, Baren A, Lui MY, Golde DW, et al. The precrystalline cytoplasmic granules of alveolar soft part sarcoma contain

monocarboxylate transporter 1 and CD147. *The American journal of pathology*. 2002 Apr;160(4):1215-21. PubMed PMID: 11943706. Pubmed Central PMCID: 1867200.

91. Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S. EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair. *Biochimie*. 2005 Mar-Apr;87(3-4):361-8. PubMed PMID: 15781323.

92. Bovenzi CD, Hamilton J, Tassone P, Johnson J, Cognetti DM, Luginbuhl A, et al. Prognostic Indications of Elevated MCT4 and CD147 across Cancer Types: A Meta-Analysis. *BioMed research international*. 2015;2015:242437. PubMed PMID: 26779534. Pubmed Central PMCID: 4686628.

93. Ganapathy V, Thangaraju M, Prasad PD. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. *Pharmacology & therapeutics*. 2009 Jan;121(1):29-40. PubMed PMID: 18992769.

94. Sedlakova O, Svastova E, Takacova M, Kopacek J, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Frontiers in physiology*. 2014 Jan 08;4:400. PubMed PMID: 24409151. Pubmed Central PMCID: 3884196.

95. Pinheiro C, Sousa B, Albergaria A, Paredes J, Dufloth R, Vieira D, et al. GLUT1 and CAIX expression profiles in breast cancer correlate with adverse prognostic factors and MCT1 overexpression. *Histology and histopathology*. 2011 Oct;26(10):1279-86. PubMed PMID: 21870331.

96. Chen CL, Chu JS, Su WC, Huang SC, Lee WY. Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1alpha, GLUT1, and CAIX. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2010 Jul;457(1):53-61. PubMed PMID: 20526721.

97. Hoskin PJ, Sibtain A, Daley FM, Wilson GD. GLUT1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in bladder cancer: relationship with vascularity and proliferation as predictors of outcome of ARCON. *British journal of cancer*. 2003 Oct 6;89(7):1290-7. PubMed PMID: 14520462. Pubmed Central PMCID: 2394309.

98. Choschzick M, Oosterwijk E, Muller V, Woelber L, Simon R, Moch H, et al. Overexpression of carbonic anhydrase IX (CAIX) is an independent unfavorable prognostic marker in endometrioid ovarian cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2011 Aug;459(2):193-200. PubMed PMID: 21691815.

99. Reiss KA, Forde PM, Brahmer JR. Harnessing the power of the immune system via blockade of PD-1 and PD-L1: a promising new anticancer strategy. *Immunotherapy*. 2014;6(4):459-75. PubMed PMID: 24815784. Pubmed Central PMCID: 4732706.

100. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2012 Mar 22;12(4):252-64. PubMed PMID: 22437870. Pubmed Central PMCID: 4856023.

101. Lee LH, Cavalcanti MS, Segal NH, Hechtman JF, Weiser MR, Smith JJ, et al. Patterns and prognostic relevance of PD-1 and PD-L1 expression in colorectal carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2016 Nov;29(11):1433-42. PubMed PMID: 27443512. Pubmed Central PMCID: 5083129.

- 102.** Bertucci F, Finetti P, Mamessier E, Pantaleo MA, Astolfi A, Ostrowski J, et al. PDL1 expression is an independent prognostic factor in localized GIST. *Oncoimmunology*. 2015 May;4(5):e1002729. PubMed PMID: 26155391. Pubmed Central PMCID: 4485716.
- 103.** Birnbaum DJ, Finetti P, Lopresti A, Gilabert M, Poizat F, Turrini O, et al. Prognostic value of PDL1 expression in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016 Aug 29. PubMed PMID: 27589570.
- 104.** Heeren AM, Punt S, Bleeker MC, Gaarenstroom KN, van der Velden J, Kenter GG, et al. Prognostic effect of different PD-L1 expression patterns in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2016 Jul;29(7):753-63. PubMed PMID: 27056074. Pubmed Central PMCID: 4931542.
- 105.** Shen JK, Cote GM, Choy E, Yang P, Harmon D, Schwab J, et al. Programmed cell death ligand 1 expression in osteosarcoma. *Cancer immunology research*. 2014 Jul;2(7):690-8. PubMed PMID: 24866169. Pubmed Central PMCID: 4082476.
- 106.** Gandini S, Massi D, Mandala M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016 Apr;100:88-98. PubMed PMID: 26895815.
- 107.** Ilie M, Hofman V, Dietel M, Soria JC, Hofman P. Assessment of the PD-L1 status by immunohistochemistry: challenges and perspectives for therapeutic strategies in lung cancer patients. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2016 May;468(5):511-25. PubMed PMID: 26915032.
- 108.** Tsukahara T, Emori M, Murata K, Mizushima E, Shibayama Y, Kubo T, et al. The future of immunotherapy for sarcoma. *Expert opinion on biological therapy*. 2016 Aug;16(8):1049-57. PubMed PMID: 27158940.
- 109.** Nowicki TS, Anderson JL, Federman N. Prospective immunotherapies in childhood sarcomas: PD1/PDL1 blockade in combination with tumor vaccines. *Pediatric research*. 2016 Mar;79(3):371-7. PubMed PMID: 26595537.
- 110.** van de Rijn M, Gilks CB. Applications of microarrays to histopathology. *Histopathology*. 2004 Feb;44(2):97-108. PubMed PMID: 14764053. Epub 2004/02/07. Eng.
- 111.** van Zwieten A. Tissue microarray technology and findings for diagnostic immunohistochemistry. *Pathology*. 2013 Jan;45(1):71-9. PubMed PMID: 23222246. Epub 2012/12/12. Eng.
- 112.** INCA. Família de Tumores de Ewing: Sarcoma de Ewing e Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Periféricos (Askin) http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=3452014 [cited 2017 10/05].
- 113.** Noujaim J, Jones RL, Swansbury J, Gonzalez D, Benson C, Judson I, et al. The spectrum of EWSR1-rearranged neoplasms at a tertiary sarcoma centre; assessing 772 tumour specimens and the value of current ancillary molecular diagnostic modalities. *British journal of cancer*. 2017 Feb 28;116(5):669-78. PubMed PMID: 28141799. Pubmed Central PMCID: 5344299.

- 114.** Bacci G, Balladelli A, Forni C, Ferrari S, Longhi A, Bacchini P, et al. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for Ewing sarcoma family tumors in patients aged between 40 and 60: report of 35 cases and comparison of results with 586 younger patients treated with the same protocols in the same years. *Cancer*. 2007 Feb 15;109(4):780-6. PubMed PMID: 17219445.
- 115.** Ladenstein R, Potschger U, Le Deley MC, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, et al. Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010 Jul 10;28(20):3284-91. PubMed PMID: 20547982.
- 116.** Lee J, Hoang BH, Ziogas A, Zell JA. Analysis of prognostic factors in Ewing sarcoma using a population-based cancer registry. *Cancer*. 2010 Apr 15;116(8):1964-73. PubMed PMID: 20151425. Epub 2010/02/13. eng.
- 117.** Karski EE, Matthay KK, Neuhaus JM, Goldsby RE, Dubois SG. Characteristics and outcomes of patients with Ewing sarcoma over 40 years of age at diagnosis. *Cancer epidemiology*. 2013 Feb;37(1):29-33. PubMed PMID: 22959474. Pubmed Central PMCID: 3543501.
- 118.** Jawad MU, Cheung MC, Min ES, Schneiderbauer MM, Koniaris LG, Scully SP. Ewing sarcoma demonstrates racial disparities in incidence-related and sex-related differences in outcome: an analysis of 1631 cases from the SEER database, 1973-2005. *Cancer*. 2009 Aug 01;115(15):3526-36. PubMed PMID: 19548262. Epub 2009/06/24. eng.
- 119.** Worch J, Matthay KK, Neuhaus J, Goldsby R, DuBois SG. Ethnic and racial differences in patients with Ewing sarcoma. *Cancer*. 2010 Feb 15;116(4):983-8. PubMed PMID: 20052725. Pubmed Central PMCID: PMC2819622. Epub 2010/01/07. eng.
- 120.** Orr WS, Denbo JW, Billups CA, Wu J, Navid F, Rao BN, et al. Analysis of prognostic factors in extraosseous Ewing sarcoma family of tumors: review of St. Jude Children's Research Hospital experience. *Annals of surgical oncology*. 2012 Nov;19(12):3816-22. PubMed PMID: 22739653.
- 121.** Lee JA, Kim DH, Lim JS, Koh JS, Kim MS, Kong CB, et al. Soft-tissue Ewing sarcoma in a low-incidence population: comparison to skeletal Ewing sarcoma for clinical characteristics and treatment outcome. *Japanese journal of clinical oncology*. 2010 Nov;40(11):1060-7. PubMed PMID: 20513751.
- 122.** Applebaum MA, Worch J, Matthay KK, Goldsby R, Neuhaus J, West DC, et al. Clinical features and outcomes in patients with extraskeletal Ewing sarcoma. *Cancer*. 2011 Jul 1;117(13):3027-32. PubMed PMID: 21692057. Pubmed Central PMCID: 3135782.
- 123.** Lussier DM, O'Neill L, Nieves LM, McAfee MS, Holechek SA, Collins AW, et al. Enhanced T-cell immunity to osteosarcoma through antibody blockade of PD-1/PD-L1 interactions. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2015 Apr;38(3):96-106. PubMed PMID: 25751499. Epub 2015/03/10. eng.
- 124.** Melo-Cardenas J, Zhang Y, Zhang DD, Fang D. Ubiquitin-specific peptidase 22 functions and its involvement in disease. *Oncotarget*. 2016 Jul 12;7(28):44848-56.

PubMed PMID: 27057639. Pubmed Central PMCID: PMC5190139. Epub 2016/04/09. eng.

125. He HL, Lee YE, Shiue YL, Lee SW, Chen TJ, Li CF. Characterization and Prognostic Significance of Methylthioadenosine Phosphorylase Deficiency in Nasopharyngeal Carcinoma. *Medicine*. 2015 Dec;94(49):e2271. PubMed PMID: 26656376. Pubmed Central PMCID: PMC5008521. Epub 2015/12/15. eng.

126. Nan DF, Y.; Xihan, D.; Liyuan, F.; Luwei, W.; Yongzhi, H., et al. MTAP deficiency is associated with an unfavourable prognosis and platinum resistance in ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017 February 15, 2017;10(2):1122-30. Epub February 1, 2017.

127. Pinto F. *From development to tumorigenesis: Dissecting the biological and clinical role of the T-Box transcription factor brachyury* [tese]. Braga, Portugal: Universidade do Minho; 2016.