Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Departamento de Genética

Desequilíbrios cromossômicos em nove casos de Osteossarcoma detectados através de Hibridação Genômica Comparativa (CGH)

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração Genética

Pós-graduando: Angel Mauricio Castro Gamero

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone

Ribeirão Preto
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Castro-Gamero, Angel Mauricio.

Desequilíbrios cromossômicos em nove casos de osteossarcoma detectados através de Hibridação Genômica Comparativa (CGH).
Ribeirão Preto, 2008.

129 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética

Orientador: Tone, Luiz Gonzaga

1. Citogenética. 2. Osteossarcoma. 3. Infância. 4. Hibridação genômica comparativa.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Angel Mauricio Castro Gamero

Desequilíbrios cromossômicos em nove
casos de osteossarcoma detectados
através de Hibridação Genômica
Comparativa (CGH)

Dissertação de Mestrado apresentada
à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de Concentração Genética

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Para a minha esposa Angela e
meu filho Ítalo, estímulos da minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone**, quem me deu a oportunidade de crescer como pessoa e como profissional, me recebendo como orientando e colaborando intensamente com o meu desenvolvimento científico e intelectual durante todo esse tempo.

À **Dra. Maria Sol Brassesco Annichini** pela paciência, apoio e profissionalismo demonstrado em todo este tempo de formação acadêmica e de bancada.

À **Dra. Rosane Gomes Queiroz** pelo apoio, disponibilidade e sugestões importantes no desenvolvimento dos meus experimentos.

À **Prof. Dra. Nilce Martinez Rossi**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP, pela atenção e apoios despendidos.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares**, coordenador da Pós-graduação do Departamento de Genética da FMRP/USP pelo apoio e exemplo de entrega constante.

À **Prof. Dra. Lucia Regina Martelli**, pelo apoio e preocupação constante durante a minha formação.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência em analisar este trabalho, enriquecendo-o com as suas críticas e sugestões.

Ao **Departamento de Genética** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em seu conjunto, pela oportunidade da realização do curso de mestrado.

Ao **Departamento de Puericultura e Pediatria** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio prestado ao Laboratório de Citogenética, local de realização de todos os meus experimentos.

Aos pacientes e seus familiares pela doação do material utilizado nesse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Elvis Terceiro Valera**, pela sua contribuição e disposição constante, assim como também pela sua experiência transmitida.

Ao **Prof Dr. Carlos Scrideli** pelo seu apoio, confiança e disposição.

Ao **Prof. Dr. Luciano Neder Serafini** e **Sra. Maria Paula Scandar** pela colaboração na caracterização patológica das amostras.

À **Prof. Dra. Silvia Regina Rogatto** pela sua valiosa contribuição para o estabelecimento da metodologia de CGH em nosso laboratório.

As funcionárias e amigas do laboratório de Citogenética-HC, **Sonia Aparecida Scandiussi, Aíde Barbosa dos Santos, Lucimar Laureano** e **Maria Lucia Machado**, pelo carinho, amizade e bom convívio, sempre prestas a ajudar.

Ao **MSc. Daniel Moreno**, pela verdadeira e fraterna amizade demonstrada desde que iniciamos a juntos a pós-graduação.

Ao **Biomédico Kleiton Borges**, pela amizade sincera e profissionalismo demonstrado diariamente.

À **Dra. Fabiana Valera** pelo seu apoio e simpatia demonstrada.

Ao **Dr. Fabio Morato** pelo apoio e colaboração desde o início do meu mestrado.

Ao **Prof. Dr. Fabio Motta**, pela amizade, apoio e determinação, muito obrigado amigo.

À **Prof. Dra. Renata Canalle** pela amizade, simpatia e colaboração.

Aos colegas pós-graduandos do laboratório de Oncologia Pediátrica: **Maria Angélica, Vanessa, Karina e Thales**. E também aos amigos com quem compartilhe bons momentos de convívio: **Priscilla e Livia**.

Aos que ajudaram que meu trabalho seja menos difícil com o uso de equipamentos, **Ana Silvia** e **Marli** do serviço de Hematologia-HC.

Às secretárias **Aparecida Helena, Evelice Visconte, Susie Nalon** e **Maria Aparecida**, pela presteza em ajudar sempre.

À instituição **CAPES** pelo apoio financeiro.

À instituição **FAEPA** pelo apoio financeiro.

Aos meus pais **Jorge** e **Maria Elena**, pelo amor, formação e valores que ensinaram para mim.

Á **Angela**, minha companheira de sempre, pelo amor, confiança e apoio incondicional.

A todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho

"O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direção para a qual nos movemos"

Oliver W. Holmes

RESUMO

CASTRO-GAMERO, AM. Desequilíbrios cromossômicos em nove casos de osteossarcoma detectados através de Hibridação Genômica Comparativa (CGH); 2008, 129p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

O osteossarcoma (OS) é o tumor ósseo maligno mais freqüente da infância e adolescência com uma taxa de sobrevida livre de eventos de 50 – 70% após 3 anos.. O pico de incidência ocorre na segunda década da vida, característica que sugere uma relação entre o rápido crescimento ósseo da adolescência e o desenvolvimento da neoplasia. Ainda, o conhecimento das bases genéticas é insuficiente. Estudos de citogenética clássica têm demonstrado que o OS caracteriza-se por exibir alta heterogeneidade cariotípica, incluindo altos graus de aneuploidia e rearranjos estruturais complexos. A técnica de CGH constitui uma ferramenta valiosa na análise do perfil genômico de tumores sólidos, e tem confirmado a complexidade das alterações cariotípicas em OS, descrita pela citogenética convencional. Não obstante, os estudos existentes são divergentes, e poucos têm estudado as informações obtidas por CGH em relação com a progressão tumoral. O objetivo do presente estudo foi identificar a presença de desequilíbrios cromossômicos em amostras de OS por meio da técnica de CGH. Os experimentos de CGH foram realizados de acordo com o descrito por Kallioniemi *et al* (1994). Foram analisadas nove amostras (3 biópsias, 5

ressecções após quimioterapia e 1 metástase). O CGH detectou desequilíbrios cromossômicos em todas as amostras. Os ganhos foram mais freqüentes que as perdas. Muitas alterações cromossômicas foram observadas, especialmente ganhos nos cromossomos 1q, 2, 3p, 4, 5p, 6, 7, 8, 11p, 14q, 16, 21q e X; e perdas nos cromossomos 1p, 2q, 3q, 5q, 9q, 11q e 17q. As regiões mínimas de sobreposição mais freqüentes foram ganhos de 2p13-p14, 2q36-q37, 4q21 e 8p22, e perdas de 1p34.2, 3q22-q23 e 3q24. Três pacientes apresentaram amostras pareadas, e as alterações cromossômicas detectadas foram muito variadas, refletindo a heterogeneidade cromossômica intratumoral em cada caso. A mais alta divergência clonal entre as amostras pareadas foi observada entre a amostra de ressecção e a amostra metastática correspondente, mostrando a complexidade cromossômica adquirida durante a progressão e metastatização no caso descrito. Ainda são necessárias investigações adicionais, que contribuam para a caracterização completa dos genes localizados nessas regiões.

Palavras Chaves: Osteossarcoma, CGH, Citogenética, Desequilíbrios.

ABSTRACT

CASTRO-GAMERO, AM. Chromosomal Imbalances in nine cases of Osteosarcoma detected by Comparative Genome Hybridization (CGH); 2008, 129p. Dissertation (Master Degree) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Osteosarcoma (OS) is the most frequent aggressive bone malignancy affecting children and young adults with an event-free survival of 50-70% after 3 years. The incidence peak occurs during the second decade of life, suggesting a relationship between rapid bone growth and the development of this tumor. The knowledge of the genetic basis behind tumor progression is still limited. Conventional cytogenetic studies have demonstrated that OS exhibits high karyotypic heterogeneity, with different degrees of aneuploidy and complex structural rearrangements. The CGH is an important tool for studying the genomic profiles of solid tumors, and has confirmed the complexity of karyotypic alterations in OS. However, previous studies have shown divergent results and few have correlated them with tumor progression. The objective of present study was to identify chromosome unbalances in nine samples of OS by CGH. 3 biopsies, 5 resections before chemotherapy and 1 metastasis were analyzed. The experiments were performed accordingly with Kallioniemi *et al* (1994). CGH detected chromosomal imbalances in all samples. Gains were more frequent than losses. Many chromosomal alterations were observed, especially gains at 1q,

2, 3p, 4, 5p, 6, 7, 8, 11p, 14q, 16, 21q and X; and losses at 1p, 2q, 3q, 5q, 9q, 11q and 17q. The minimal regions of superposition were gains of 2p13-p14, 2q36-q37, 4q21 and 8p22, and losses of 1p43.2, 3q22-q23 and 3q24. Three patients had consecutive samples, and the chromosomal alterations varied, reflecting the chromosomal heterogeneity for each case. The highest clonal divergence among the consecutive samples was observed between resection and the corresponding metastatic sample, showing the chromosomal complexity acquired during the progression and dissemination in this case. Additional investigations for the characterization of genes at these regions are necessary.

Keywords: Osteosarcoma, CGH, Cytogenetics, Imbalances.

LISTA DE SIGLAS

BSA – *Bovine serum albumin*

CGH – Hibridação Genômica Comparativa

cGy – Centi Grey

DAPI - 4,6-diamidino-2-phenyl-indole

dm - *double minutes*

DNA - Ácido desoxirribonucléico

FISH - Hibridação *in situ* fluorescente

FITC – isotiacianato de fluoresceína

FMRP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

GTG – Banda G através de Temperatura e corada com Giemsa.

HCFMRP- Hospital Das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

hsr - Regiões Homogeneamente Coradas

IC – Instabilidade cromossômica

IRP – Intervalo de Referência Padrão.

OMS – Organização Mundial da Saúde

OS – Osteossarcoma

PBS – Solução Buffer Fosfato

QT – Quimioterapia

RI - Radiação ionizante

rpm - Rotações por minuto

SKY - Cariotipagem Espectral

SSC – Solução *Saline-Sodium Citrate*

TRITC – isotiacianato tetrametilrodamina fluorescente

USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 HISTÓRICO.....	2
1.2. OSTEOSSARCOMA	4
1.2.1. Definição e Aspectos Epidemiológicos.....	4
1.2.2. Comportamento Biológico do Osteossarcoma.....	6
1.2.3. Diagnostico, Patologia, Estadiamento e Fatores de Risco...	8
1.2.4. Fatores Prognósticos e Tratamento.....	11
1.2.5. Etiologia e Genética.....	12
1.2.6. Aspectos Citogenéticos.....	15
1.3. HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA	17
1.4. ESTUDOS DE CGH EM OSTEOSSARCOMAS.....	21
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1.Casuística.....	27
3.2. Microdissecção.....	28
3.3. Extração de DNA.....	30
3.4. Amostras de DNA controle.....	30
3.5 Hibridação Genômica Comparativa (CGH).....	31
3.5.1. Marcação do DNA genômico.....	31
3.5.2. Precipitação e preparação das sondas.....	32
3.5.3. Preparo das lâminas.....	33

3.5.4. Hibridação.....	33
3.5.5. Lavagem pós-hibridação.....	33
3.5.6. Detecção por Imunofluorescencia.....	34
3.6. <i>Hardware e Software</i>	34.
3.7. Análise digital da CGH.....	35
3.7.1. Aquisição de imagens.....	35
3.7.2. Cariotipagem da imagem DAPI invertida.....	35
3.7.3. Verificação das imagens de fluorescência e Geração dos perfis-razão.....	36
3.7.4. Intervalo de Referência Padrão (IRP).....	36
4. RESULTADOS.....	37
5. DISCUSSÃO.....	52
5.1 Alterações Cromossômicas Mais Frequentes	57
5.2 Outras alterações.....	72
5.3 Amostras pareadas	76
5.3.1 Pacientes A e B.....	77
5.3.2 Paciente C.....	78
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8. ANEXOS.....	108

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Os primeiros estudos com observações relevantes sobre a origem e desenvolvimento do câncer datam de 1890, quando o patologista alemão David Von Hanseemann observou irregularidades nucleares e mitóticas em biópsias de carcinomas (citado por MITELMAN, 2000). Estas observações iniciais possibilitaram que, em 1914, Theodor Boveri apresentasse a Teoria Clonal do Câncer, na qual postulava basicamente que neoplasias malignas freqüentemente desenvolvem-se como um clone originado de uma célula cromossomicamente anormal (citado por MITELMAN, 2000). Não obstante, foi somente na década de 60 que os estudos de células neoplásicas começaram a evoluir e tal hipótese pode ser comprovada, constituindo-se como marco inicial, a descrição do cromossomo *Philadelphia* (Ph) nas leucemias mielóides crônicas (NOWELL; HUNGERFORD, 1960).

As primeiras indicações de que as alterações cariotípicas em tumores sólidos, assim como nas doenças hematopoiéticas, não ocorriam ao acaso foram descritas por Levan (1966) e van Steenis (1966), os quais de forma independente, observaram que determinados cromossomos apareciam em número aumentado e outros faltavam sistematicamente. A partir da década de 70, com a introdução das técnicas de bandeamento dos cromossomos humanos (CASPERSSON *et al.*, 1970a,b), a área da citogenética e câncer apresentou um notável desenvolvimento contribuindo de forma importante

para o esclarecimento das aberrações cromossômicas envolvidas e para a formulação de novos conceitos sobre a etiologia genética do câncer.

Os métodos de genética e citogenética molecular, baseados na hibridação *in situ* por fluorescência, proporcionaram nas últimas décadas, um avanço no mapeamento de genes e determinaram uma maior resolução na identificação de aberrações cromossômicas em neoplasias humanas. Nos últimos 25 anos, os estudos de citogenética clássica e molecular revelaram mais de 600 rearranjos cromossômicos balanceados, sendo descritos cerca de 100 genes envolvidos em rearranjos que podem estar associados a doenças neoplásicas (MITELMAN, 2000). Entretanto, estes dados resultam, principalmente, do estudo de neoplasias hematopoiéticas, caracterizando uma desproporção quanto aos estudos citogenéticos em tumores de tecidos sólidos, que constituem menos de um terço dos realizados em cânceres humanos. Esses tumores, por outro lado, são os mais freqüentes e são responsáveis por uma importante morbidade e mortalidade da população mundial (MITELMAN *et al.*, 1997a).

O número limitado de estudos citogenéticos nos tumores sólidos em relação aos hematopoiéticos deve-se a vários fatores, incluindo os de origem metodológica. A obtenção e a qualidade dos cromossomos é, geralmente, insatisfatória; ao contrário das doenças hematopoiéticas, a maioria dos tumores sólidos já tem, no diagnóstico, uma grande quantidade de aberrações cromossômicas adquiridas durante a progressão do tumor. Deste modo, mesmo quando a qualidade dos cromossomos é satisfatória e cada

anormalidade pode ser caracterizada, a diferenciação entre aberrações primárias, patogeneticamente essenciais, e aberrações evolutivamente secundárias é mais difícil de ser identificada em tumores sólidos do que em neoplasias hematopoiéticas (MITELMAN, 2000).

Dentre essas neoplasias sólidas investigadas citogeneticamente, os sarcomas, tumores originários de células mesenquimais malignas, tem sido classificados em duas grandes categorias: sarcomas portadores de alterações citogenéticas típicas e específicas, com cariótipos relativamente simples; e sarcomas com alterações não específicas, frequentemente acompanhadas de cariótipos complexos (SKUBIT; D'ADAMO, 2007). Em ambos casos, o entendimento acurado da patofisiologia desses tumores, em particular sarcomas pediátricos, pode encaminhar ao desenvolvimento de novas tentativas terapêuticas (SLATER; SHIPLEY, 2007; SKUBITZ; D'ADAMO, 2007).

1.2 OSTEOSSARCOMA.

1.2.1 Definição e Aspectos Epidemiológicos.

Osteossarcoma (OS) representa uma classe de tumor ósseo maligno, que se origina a partir das células primitivas mesenquimais formadoras do osso. Caracteriza-se pela produção de substância osteóide neoplásica e pela proliferação de células malignas do estroma (LINK; EILBER, 1993). A

localização predominante é nas metáfises dos ossos longos (FERRÍS *et al.*, 2005), podendo ocorrer em qualquer osso. Os sítios primários mais comuns são fêmur distal, tibia e úmero proximal, com aproximadamente 50% dos casos originados próximo do joelho (MARINA *et al.*, 2004).

Apesar dos tumores primários de osso serem raros em pacientes jovens, eles constituem o sexto grupo mais comum em crianças e a terceira neoplasia mais freqüente em adolescentes e adultos jovens. Apenas a metade dos tumores ósseos são malignos. Desses, o OS representa aproximadamente 60%, sendo considerado o tumor ósseo maligno mais freqüente na idade pediátrica (LINK; EILBER, 1993).

O OS apresenta uma distribuição bi-modal por idade, sendo o primeiro na segunda década da vida (idade modal: 16 anos em meninas e 18 anos em meninos), e outro depois dos 65 anos de idade (FERRÍS *et al.*, 2005). Cerca do 75% dos casos de OS acontecem em pacientes entre os 15-25 anos de idade (PICCI, 2007). A incidência na infância até os 10 anos é de 1,7 por milhão, e entre 10 e 19 anos, 8,2 por milhão de indivíduos. (NAGARAJAN *et al.*, 2003). Pacientes do sexo masculino são mais freqüentemente afetados na maioria das séries descritas (FERRÍS *et al.*, 2005). No Brasil, com uma população total de 169 milhões de pessoas, dos quais 49 milhões têm de 0 a 15 anos de idade e 16 milhões entre 15 e 19 anos de idade, estima-se que anualmente são diagnosticados 350 novos casos de OS (PETRILLI, 2006).

1.2.2 Comportamento Biológico do Osteossarcoma.

O OS apresenta um crescimento radial e forma uma massa esférica; a mesma que ao penetrar à zona cortical dos ossos, comprime os músculos circunvizinhos dentro de uma camada pseudocapsular chamada "zona reativa". Os nódulos de tumor (micro-extensões da massa primitiva) que invadem a zona reativa são denominados "satélites". A massa tumoral pode apresentar metástases, regionalmente (dentro da mesma extremidade), ou sistemicamente (a outros órgãos tais como os pulmões). Os nódulos tumorais que crescem fora da borda reativa mas dentro do mesmo osso (metástase intra-óssea), ou através das articulações vizinhas (metástase trans-articular) são chamadas de lesões múltiplas ou *skip lesions* (Figura 1) (WITTIG *et al.*, 2002).

A metástase sistêmica ocorre geralmente nos pulmões. Os ossos representam o segundo lugar mais comum de ocorrência de metástase, e freqüentemente são envolvidos somente após a metástase pulmonar. A metástase nos ossos distantes representa o último estágio da doença, e normalmente está associado com um prognóstico desfavorável (WITTIG *et al.*, 2002). Cerca de 80% dos osteossarcomas não são metastáticos ao diagnóstico. O paciente tipicamente apresenta dores intensas durante vários meses, as quais podem inesperadamente se tornar mais intensas. O aumento na gravidade dos sintomas pode estar relacionado com a invasão da zona

cortical do osso e irritação do periósteo, ou com fratura patológica (WITTIG *et al.*, 2002; MARINA *et al.*, 2004).

Figura 1. Padrão de crescimento biológico do osteossarcoma (Witting, 2002)

Existe uma forte associação entre o rápido crescimento ósseo e o desenvolvimento desta neoplasia. Varias características da doença têm sido citadas suportando esta associação. Entre elas: o pico de incidência na etapa adolescente da vida; o aparecimento da doença em meninas antes do que em meninos, correspondendo com o estirão puberal e idade esquelética mais avançada; a predileção pelas metáfises dos ossos que

crecem mais rapidamente nos adolescentes (fêmur distal, tíbia e úmero proximal). Essas evidências, tem levado à especulação que o OS assim como também outros tumores ósseos surgem a partir de aberrações do processo normal de crescimento ósseo em extensão e remodelamento, células de proliferação rápida podem ser particularmente susceptíveis a agentes oncogênicos, erros mitóticos, ou outros eventos que encaminhem a transformação neoplásica (LINK; EILBER, 1993).

1.2.3 Diagnostico, Patologia, Estadiamento e Fatores de Risco

O diagnostico do OS requer a combinação das informações de apresentação clínica, estudos radiológicos e avaliação histopatológica. Os sintomas clínicos iniciais nestes tumores são dor freqüente na área afetada, o qual também pode estar associado com edema dos tecidos moles circunvizinhos ou limitação de movimento na articulação adjacente. A avaliação radiológica é vital na definição do diagnostico correto. Os achados mais comuns envolvem lesões líticas intramedulares junto a áreas dispersas de neoformação de tecido ósseo, freqüentemente acompanhadas de destruição do córtex e extensão da massa tumoral dentro do tecido mole circundante. A cintilografia óssea, tomografia computadorizada, ressonância magnética e angiografia são também análises de imagem importantes na determinação da extensão neoplásica.

Todas elas são de grande ajuda para a determinação do tipo de cirurgia a ser realizada (PICCI, 2007).

A avaliação patológica inicial é realizada freqüentemente com material de biópsias, onde as características histológicas típicas junto com os dados radiológicos apropriados permitem o diagnostico definitivo. Aproximadamente 75% dos osteossarcomas têm sua origem na cavidade intramedular, sendo chamados de OS "convencional", ou "clássico" (citado por MARINA *et al.*, 2004). A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica histologicamente três subtipos principais de osteossarcomas convencionais: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico; de acordo com o componente histológico predominante da matriz; adicionalmente, a OMS reconhece duas variantes histológicas: OS telangiectático e de células pequenas (citado por MARINA *et al.*, 2004; LONGHI *et al.*, 2006). O 25% restante representa subgrupos menos comuns, os quais incluem o OS secundário, pós-irradiação, multifocal, paraosteal e periosteal (HUVOS, 1991; citado por BRIDGE *et al.*, 1997). O OS também pode ser dividido em variantes de baixo e alto grau, dependendo da celularidade, pleomorfismo, anaplasia e número de mitoses (WITTIG *et al.*, 2002). Histologicamente, todos os osteossarcomas apresentam proliferação de células mesenquimais malignas e produção de substância osteóide neoplásica pelas células tumorais. A quantidade de matriz óssea varia dentro do mesmo tumor, e entre tumores, razão pela qual a identificação de osteóide ao diagnóstico requer grande amostragem. A matriz fibrosa, e/ou condróide, pode também estar presente refletindo a

origem mesenquimal das células malignas e sua habilidade para diferenciar-se em vários tipos celulares (MARINA *et al.*, 2004).

Uma vez confirmado o diagnóstico de OS, exames podem ser realizados para detectar se as células neoplásicas se disseminaram por outras partes do organismo (metástase). Enneking *et al.* (1980) desenvolveram um sistema de estadiamento da Sociedade de Tumores Musculo-esqueléticos (*Musculoskeletal Tumour Society*). Este sistema está baseado no grau do tumor (I =baixo grau; II = alto grau), extensão tumoral (A = intra-compartamental; B = extra-compartamental), e presença de metástase regional ou distante (III).

Dentre os fatores de risco relacionados com a origem dos osteossarcomas estão: (a) patologias ósseas preexistentes (principalmente a Enfermidade de Paget); (b) fatores genéticos (Retinoblastoma, Síndrome de Li-Fraumeni, Síndrome de Rothmund-Thompsom, Síndrome de Bloom, Osteosarcoma familiar e Anemia de Diamond-Blackfan); (c) fatores químicos (exposição a substâncias antineoplásicas); (d) fatores físicos (exposição à radiações ionizantes); (e) fatores biológicos (crescimento ósseo acelerado durante as duas primeiras décadas da vida, e portanto maior susceptibilidade ou vulnerabilidade); (f) fatores ocupacionais, e (g) outros fatores (implantes ósseos artificiais e traumatismos) (FERRIS *et al.*, 2005).

1.2.4 Fatores Prognósticos e Tratamento.

Os fatores prognósticos tradicionais incluem dados demográficos (sexo, idade), tamanho do tumor, localização do mesmo, estadiamento, presença de metástase e resposta à quimioterapia (QT), sendo eles determinantes-chaves na determinação do prognóstico (CLARK *et al.*, 2008).

Antes da introdução da QT nos anos 70, o prognóstico de um paciente com OS era funesto. A partir dessa data, o prognóstico melhorou significativamente, os critérios de tratamento transformaram-se num procedimento padrão adotado em muitos centros de referência. Atualmente as metodologias utilizadas no tratamento do OS incluem QT sistêmica pre-operatória ("neoadjuvante"), seguido por ressecção cirúrgica local, e posteriormente QT pós-operatória ("adjuvante") (BIELACK *et al.*, 1999, 2002). As drogas comumente usadas na QT neoadjuvante são cisplatina, doxorubicina, e altas doses de metotrexate (MARINA *et al.*, 2004). Contudo, o índice de sobrevida livre de eventos até 5 anos é de 60-70%. São considerados fatores negativos no prognóstico, volume tumoral grande, localização axial, metástase primária, níveis altos de fosfatase alcalina e uma resposta pobre à QT pré-operatória neoadjuvante (BIELACK *et al.*, 1999, 2002).

1.2.5 Etiologia e Genética.

Conhecendo a etiologia do OS pode-se pensar no desenvolvimento de novas tentativas terapêuticas. Desafortunadamente, muitos casos de OS são aleatórios, com poucos dados de associações genéticas ou exposição ambiental conhecida.

Poucas doenças são conhecidas por apresentar maior risco para desenvolver OS. Os pacientes com retinoblastoma possuem mutação no gene supressor de tumores *RB1*, resultando em um risco significativamente mais alto para desenvolver OS e outras neoplasias. Dessa mesma forma, os pacientes com a síndrome de Li – Fraumeni apresentam mutação no gene supressor de tumores *TP53*. Esses pacientes apresentam risco maior para o desenvolvimento de múltiplos tumores, incluindo OS (HAYDEN *et al.*, 2006).

Os genes *RB1* e *TP53* estão envolvidos na regulação de duas grandes vias que atuam na transição G1 - S do ciclo celular. Vários estudos em osteossarcomas esporádicos demonstraram a presença de diversas alterações nesses dois genes tais como rearranjos gênicos estruturais, pontos de mutação, assim como perda de heterozigosidade (BELCHIS *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 1990; HUNG *et al.* 1997). Ao mesmo tempo, muitas investigações têm encontrado lesões nos genes que formam parte da via do *RB1* e *TP53*, demonstrando que essas alterações podem alcançar efeitos celulares equivalentes. Entre os genes, participantes da via do *RB1* e *TP53*, que apresentam alterações com efeitos equivalentes estão o *P16* e *P14*

(deleções) e o *CDK4* e *MDM2* (amplificações) (citado por SANDBERG *et al.*, 2003).

Outras síndromes associadas com OS incluem as síndromes de Rothmund-Thomson e de Bloom. A primeira está associada a mutações no gene *RECQL4* e a síndrome de Bloom com mutação no gene *BLM*; esses genes codificam helicases, enzimas que ajudam no desenrolamento do DNA permitindo a duplicação normal do material genético (HAYDEN *et al.*, 2006). Outra característica comum entre essas duas síndromes consiste na inativação nas células germinativas dos genes codificadores das proteínas reparadoras do dano originado por carcinógenos físicos e químicos sobre a estrutura do DNA. O déficit no reparo dessas mutações origina o desenvolvimento de neoplasias típicas de cada síndrome. Do mesmo modo, a complexidade destes mecanismos gênicos condiciona as diferentes manifestações clínicas dos pacientes (citado por FERRÍS *et al.*, 2005).

São poucos os conhecimentos que relacionam exposições ambientais com OS. Nos seres humanos os únicos compostos químicos que se associam com um risco maior de OS, são os agentes antineoplásicos (FUCHS; PRITCHARD, 2002). Manifestam-se com a aparição de OS como segundo tumor nos sobreviventes de câncer pediátrico, sendo que o risco de OS é independente do efeito sinérgico da radioterapia e do tipo tumoral prévio. Os agentes antineoplásicos associados a maior risco de OS são os seguintes: ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, procarbacina, tiotepa, bleomicina, carmustina, lamustina, cisplatina, carboplatina, altretamina, amocitina,

belustine, cariolisina, clormetina, cloraminofeno, dacarbacina, estramustina, manomustina, sarcolisina, espamustina e tretamina (LE VU *et al.*, 1998).

A radiação ionizante (RI) é o cancerígeno humano mais extensamente estudado, associado à maioria de neoplasias é o principal agente ambiental implicado na etiopatogenia do OS. O tecido ósseo adulto é considerado relativamente resistente à ação carcinogénica da RI, incrementando o risco só depois de ser submetido à doses terapêuticas superiores a 1000 cGy. A RI está implicada em 3% dos osteossarcomas. As doses administradas que são requeridas para o desenvolvimento de um OS secundário são desconhecidas. O incremento de risco de OS secundário após irradiação está relacionado diretamente com a dose total de RI administrada. O período de latência entre a irradiação e o diagnóstico do OS apresenta tempos médios de 12 –16 anos, com limites entre 4 e 40 anos (HAWKINS *et al.*, 1996)

Dentre os agentes biológicos que tem associação comprovada para desenvolvimento de OS, só um pode ser mencionado, o vírus de RNA denominado FBJ do camundongo (nomeado pelos seus descobridores, Finkel, Biskis, e Jinkins). O mesmo que tem sido isolado de sarcomas espontâneos, e é o único vírus que, além dos tumores desenvolvidos na zona de inoculação, gera exclusivamente sarcomas ósseos. Os osteossarcomas induzidos pelo vírus FBJ evidenciam numerosas partículas de RNA com microscopia eletrónica. É um vírus muito potente, já que ao diluí-lo e ao inoculá-lo em camundongos recém nascidos, 100% desenvolve OS com

metástases ósseas multifocais (FINKEL *et al.*, 1966). Outro vírus estudado é o vírus SV40, um poliomavirus de DNA, que tem sido encontrado em 50% de osteossarcomas. O significado destes achados é ainda desconhecido (GORLICK *et al.*, 2003).

1.2.6 Aspectos Citogenéticos.

O OS é caracterizado por apresentar alterações cromossômicas complexas, sem a presença de translocações cromossômicas definidas e específicas, apresentando freqüentemente heterogeneidade de célula para célula. Anomalias citogenéticas têm sido encontradas em quase 70% dos casos, com grande variabilidade dentro do mesmo paciente. Os tumores comumente apresentam múltiplos clones, com diferentes graus de ploidia variando desde um conjunto haplóide ($2n=23$) até quase-hexaploide ($2n=138$) (SANDBERG *et al.*, 2003). Cerca de 58% dos casos apresentam cromossomos marcadores (cromossomos anormais, os quais não podem ser identificados pelo padrão de bandamento GTG). Cromossomos em anel estão presentes em 7% dos casos, acompanhados por múltiplas anomalias numéricas (65%), e estruturais (72%). Adicionalmente, existe evidência de ampliações genômicas (regiões homogeneamente coradas - hsr, ou *double minutes*) em cerca de um, a cada três casos (MARINA *et al.*, 2004).

Entre as anormalidades numéricas freqüentemente encontradas estão: trissomia do cromossomo 1, monossomia dos cromossomos 9, 10, 13 e 17, e

perda parcial ou completa do braço longo do cromossomo 6 (6q). Além disso, as seguintes bandas ou regiões tem sido principalmente envolvidas em rearranjos estruturais: 1p11~p13, 1q10~q12, 1q11~q12, 1q21~q22, 11p14~p15, 12p13, 14p11~p13, 15p11~p13, 17p12~p13, 19q13 e 22q11~q13. (BRIDGE *et al.*, 1997; MERTENS *et al.*, 1993; citado por SANDBERG *et al.*, 2003).

Alterações cromossômicas simples são observadas em menos de 5% dos casos de osteossarcomas, e consistem de anomalias estruturais, tais como add(11)(p15), add(14)(q32), t(2;13)(p13;q24), t(10;13)(q22;q21), t(2;4)(p23;q21), e inv(6)(p23q15), e/ou anomalias numéricas, como a trissomia do cromossomo 17; sendo que todas estas alterações foram únicas em cada paciente (SANDBERG *et al.*, 2003).

Os mecanismos que geram aneuploidia extrema, tão característica do OS ainda são desconhecidos. Estudos baseados em hibridação *in situ* fluorescente (FISH) interfásica avaliaram a heterogeneidade ou variação célula – célula de diferentes cromossomos, assim como também, a associação entre as mutações no gene *TP53* e aberrações centrosômicas na geração de aneuploidias em tumores primários e linhas celulares de OS. Esses estudos descrevem à instabilidade cromossômica (IC) como uma característica consistente do OS, e possivelmente alguns mecanismos de segregação cromossômica possam ser interrompidos ou desorganizados por aberrações nos centrosomos (AL-ROMAIIH *et al.*, 2003).

Atualmente a citogenética clássica (Bandamento GTG) combinada às técnicas de FISH acrescenta sensibilidade para a detecção de

anormalidades cromossômicas crípticas em osteossarcomas. A utilização das novas estratégias de citogenética molecular baseadas em FISH, tais como a Cariotipagem Espectral (SKY) e a Hibridação Genômica Comparativa (CGH), têm permitido a identificação de cromossomos marcadores e alterações cromossômicas que geralmente não podem ser detectadas pelos métodos convencionais.

1.3 HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA.

A hibridação genômica comparativa (CGH) é uma metodologia de citogenética molecular que permite a análise em um único experimento, de alterações do número de cópias de DNA de todo o genoma.

A CGH é extensivamente utilizada na identificação de alterações genéticas de diversas neoplasias, sendo vantajosa por não depender de células em metáfase do tecido em estudo e nem do conhecimento prévio de regiões genômicas afetadas; requer apenas obtenção de DNA das células a serem investigadas. Desta forma, a CGH é útil na investigação de desequilíbrios genômicos, especialmente em tumores sólidos como o OS (ROGATTO, 2000).

CGH é um procedimento baseado na hibridação *in situ* por fluorescência competitiva onde se utiliza uma amostra de DNA genômico teste (amostra tumoral de cada paciente) e uma de DNA genômico de referência (usado como controle, podendo ser uma amostra de tecido

normal, como sangue ou pele, do paciente, ou ainda, pode ser uma amostra de um indivíduo cariotipicamente normal). As amostras são marcadas com diferentes moléculas repórteres, normalmente biotina e digoxigenina. O DNA genômico teste (marcado com biotina) e o DNA genômico de referência (marcado com digoxigenina) são simultaneamente precipitados na presença de DNA Cot-1, que contém seqüências repetitivas do genoma e suprime a ligação de DNAs marcados na região centromérica e de heterocromatina, regiões que são excluídas da análise, devido à alta variabilidade que essas seqüências apresentam. Posteriormente, ambos DNAs são hibridados simultaneamente a cromossomos metafásicos normais (controle) que servem como base da hibridação. Estes cromossomos geralmente não são do paciente, mas são, preferencialmente, de um indivíduo cariotipicamente normal (KALLIONIEMI *et al.*, 1992) (Figura 2).

A hibridação competitiva realizada sobre as metáfases normais de linfócitos de sangue periférico é detectada por meio de dois fluorocromos que se ligam às moléculas repórteres, como o isotiacianato de fluoresceína (FITC) de cor verde, que se liga à biotina, e o isotiacianato tetrametilrodamina fluorescente (TRITC) de cor vermelha, que se liga à digoxigenina através de anticorpos conjugados. As metáfases são posteriormente coradas geralmente com 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), resultando em um padrão de bandas que permite a identificação e classificação dos cromossomos (KALLIONIEMI *et al.*, 1992; KALLIONIEMI *et al.*, 1994). Na CGH as sondas combinadas competem pelos sítios de hibridação

complementares, conseqüentemente, se uma região apresenta ganho e/ou amplificação do número de cópias de DNA na amostra tumoral em comparação com o DNA de referência (normal), estes são visualizados por um excesso de sinal verde, e se uma região apresenta perda e/ou deleção, estas são visualizadas por um excesso de sinal vermelho. Os sinais de fluorescência são medidos quantitativamente por meio de uma análise digital de imagem utilizando-se um *software* específico, que converte os dados da intensidade de hibridação em um perfil linear ao longo de cada cromossomo. Assim, a razão de fluorescência verde : vermelho reflete a quantidade relativa de seqüências de DNA no tumor (Figura 2.). A sensibilidade da técnica é restrita à pureza da população celular usada no estudo, e à extensão e tamanho das alterações. CGH não detecta alterações de baixa freqüência, ou seja, as alterações devem estar presentes em uma porcentagem grande de células, pois esta técnica detecta apenas o clone predominante (KALLIONIEMI *et al.*, 1994; WEISS *et al.*, 1999).

A CGH metafásica tem se constituído uma metodologia com o potencial de realizar um mapeamento de regiões cromossômicas que contem oncogenes ou genes supressores de tumor, mas, limitada pela sua relativa baixa sensibilidade. Experimentos de CGH metafásica tem demonstrado que podem ser detectáveis, através de limiares diagnósticos fixos, deleções de copia simples que se encontram na faixa de 10-20 Mb (KALLIONIEMI *et al.*, 1994; BENTZ *et al.*, 1998). Kirchhoff *et al.* (1998)

modificaram o critério de detecção de alterações cromossômicas na CGH, utilizando um Intervalo de Referência Padrão (IRP) como perfil controle. O IRP é baseado em amostras de indivíduos normais e foi utilizado na detecção de alterações descritas previamente. Esse estudo demonstrou que o uso de IRP aumenta a sensibilidade e especificidade da CGH quando comparado com limiares diagnósticos fixos, conseguindo-se detectar deleções na ordem de 3Mb (KIRCHHOFF *et al.*, 1998, 1999).

Figura 2. Representação esquemática da CGH

1.4 ESTUDOS DE CGH EM OSTEOSSARCOMAS.

Nos últimos anos, a CGH tem sido utilizada em uma ampla gama de neoplasias, com o objetivo de investigar alterações no número de cópias de seqüências de DNA no genoma total. Os estudos de CGH realizados em OS têm confirmado o padrão muito complexo de alterações citogenéticas, como descrito pela citogenética clássica e análises com FISH, apesar de não existir um critério de detecção padrão. Algumas regiões parecem ser mais afetadas que outras (SANDBERG *et al.*, 2003). As descrições na literatura de estudos CGH em OS correspondem principalmente a ganhos nas regiões 8q, 1p, 6p, 1q, 17p, 4q e 5q; e perdas em 10p, 2q, 6q, 10q, 13q, 16p e 18q. Também são descritas regiões com altos níveis de amplificação em 8q23-24, 17p11.2, 1q21, 6p12-21 e 12q12-13 (TARKKANEN *et al.*, 1995; FORUS *et al.*, 1995b; TARKKANEN *et al.*, 1999; STOCK *et al.*, 2000; ZIELENSKA *et al.*, 2001; OZAKI *et al.*, 2002; BATANIAN *et al.*, 2002; BARUFFI *et al.*, 2003; OVERHOLTZER *et al.*, 2003; LAU *et al.*, 2004; OHATA *et al.*, 2006; AGUIAR *et al.*, 2007).

Algumas investigações têm associado resultado das análises com CGH com parâmetros clínicos com o objetivo de encontrar marcadores prognósticos. Os pacientes com aumento no número de cópias em 8q13 e/ou 8q21.3-q22 apresentaram menor sobrevida livre de eventos estatisticamente significativa e uma tendência para sobrevida global diminuída (TARKKANEN *et al.*, 1999); porém, ganho do cromossomo 8 não

tem sido reconhecido como uma alteração cromossômica comum através da citogenética convencional (BRIDGE *et al.*, 1997).

Tarkkanen *et al.* (1999) relataram que pacientes com um incremento no número de cópias em 1q21, 8q21.3-q22 e/ou 8q11-q13 apresentaram uma tendência para menor sobrevida global. Em contraste, Stock *et al.* (2000) encontraram que o incremento no número de cópias em 8q e 1q21 não tem um impacto desfavorável sobre o prognóstico.

Ozaki *et al.*, 2002 determinaram que o ganho de 19p ou perda de 9p teve correlação com uma baixa resposta à QT; também foi observada baixa sobrevida livre de eventos em pacientes com metástases primária, baixa resposta à QT, alto nível de ganho em 19p ou perda em 13q14. As perdas em 10q21-q22 ou 5q tiveram correlação com um prognóstico favorável. Apesar do OS caracterizar-se por apresentar uma grande quantidade de alterações genômicas, aparentemente, só algumas poucas são diretamente relacionadas com o prognóstico do paciente (OZAKI *et al.*, 2002).

Apesar de existirem algumas regiões comuns de desequilíbrios cromossômicos entre os diferentes estudos, existem dados contraditórios e só alguns estudos tem investigado a presença de marcadores genéticos associados com prognóstico clínico.

Além disso, existem poucos estudos de CGH realizados em amostras pareadas ou sucessivas de OS. A análise de amostras sucessivas do mesmo paciente tem possibilitado a determinação do grau de divergência clonal e heterogeneidade genética que caracterizam o processo de progressão e

disseminação de várias neoplasias, com importância fundamental não apenas para a melhor compreensão da sua biologia, mas também como indicativa de um provável comportamento clínico mais agressivo (KUUKASJARVI *et al.*, 1997). São necessárias investigações adicionais com o objetivo de caracterizar as bases citogenéticas envolvidas com a oncogênese do OS, principalmente com os processos de tumorigênese e progressão neoplásica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Analisar através da Hibridização Genômica Comparativa (CGH) nove amostras de osteossarcoma.

2.2 Específicos:

Identificar a presença de alterações do número de cópias de DNA em diferentes regiões do genoma humano em nove amostras de osteossarcoma, utilizando o método de CGH;

Identificar as alterações no número de cópias de DNA mais frequentes nas amostras primárias.

Comparar as anormalidades observadas entre as amostras pareadas e sucessivas, em relação à presença de alterações no número de cópias de DNA;

Comparar os resultados observados com os existentes na literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de OS foram coletadas pelo serviço de Ortopedia Oncológica HC-FMRP do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor da FMRP-USP. Imediatamente após cirurgia, as amostras de tumor foram congeladas a -80 °C e estocadas no Banco de Tumores do Laboratório de Oncologia Pediátrica do Hospital das Clínicas (aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Proc. 9373/2003) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Os experimentos de CGH foram realizados no Laboratório de Oncologia Pediátrica do Hospital das Clínicas - FMRP. Todas as amostras foram obtidas após assinatura do termo de consentimento pelos pacientes ou seus responsáveis (anexo I). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP (Processo HCRP nº 12878/2006) em 18 de dezembro de 2006 (anexo II).

3.1 Casuística:

Para o presente trabalho foram selecionadas 23 amostras de OS provenientes de 17 crianças e adolescentes diagnosticados pelo Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC/FMRP/USP), armazenadas no Banco de Tumores do Laboratório de Oncologia Pediátrica do HC/FMRP/USP.

3.2 Microdissecção

Todas as amostras de tumor selecionadas foram submetidas à microdissecção no Laboratório de Patologia da FMRP-USP, sob a responsabilidade do Prof Dr. Luciano Neder, com o intuito de descartar o máximo de interferentes como tecido necrótico, tecido normal, bem como avaliar a integridade do tecido tumoral a ser submetido ao estudo citogenético, e determinar o índice de celularidade em cada amostra (Tabela 1).

Para a microdissecção, a amostra foi colocada sobre plataforma previamente resfriada e protegida, imediatamente posicionada na base de corte do criostato sob o gel *Tissue Tek*. Após um novo congelamento rápido em nitrogênio líquido, a amostra foi então posicionada para o corte. Foram utilizados não mais que dois cortes por material com espessura de aproximadamente 8-10µm, o corte foi imediatamente capturado com lamínula de vidro, corado por hematoxilina e eosina e avaliado por aposição de imagem.

TABELA 1. Seleção de amostras após microdissecção.

No	Amostra (Tu)	Dados Microdissecção	Celularidade (%)	Seleção
1	71	Necrose 100%	ND	Não
2	146	Osteossarcoma	40	Sim
3	156	Osteossarcoma	90	Sim
4	208	Borda e necrose (Ausência de neoplasia)	ND	Não
5	214	Osteossarcoma	ND	Sim
6	220	Osteossarcoma	ND	Sim
7	229	Osteossarcoma	40	Sim
8	263	Borda de Lesão (Ausência de neoplasia)	ND	Não
9	372	Tecido conjuntivo (Ausência de neoplasia)	ND	Não
10	419	Osteossarcoma	40	Sim
11	431	Osteossarcoma	30	Sim
12	480	Osteossarcoma	90	Sim
13	501	Ausência de neoplasia. Fibroses	ND	Não
14	507	Osteossarcoma condroblástico	80	Sim
15	532	Osteossarcoma condroblástico	20	Sim
16	590	Osteossarcoma	ND	Sim
17	670	Borda de lesão (Ausência de neoplasia)	ND	Não
18	735	Osteossarcoma	70	Sim
19	856	Osteossarcoma	40	Sim
20	1022	Osteossarcoma	90	Sim
21	1024	Osteossarcoma	50	Sim
22	1169	Osteossarcoma	50	Sim
23	1206	Osteossarcoma	70	Sim

ND, no determinado

3.3 Extração do DNA

As peças tumorais selecionadas após microdissecção foram desagregadas mecanicamente em nitrogênio líquido e resuspendidas em PBS até obter uma suspensão celular homogênea. Para as extrações de DNA genômico de alto peso molecular foram utilizados o Kit de purificação de DNA genômico WIZARD® (Promega) segundo as especificações do fabricante ou de acordo com o tratamento com proteinase K, extração com fenol-cloroformio, e precipitação com etanol.

O DNA resultante foi testado para avaliar sua qualidade em gel de agarose 1% e quantificado num espectrofotômetro GENEQuant. Foram selecionadas como adequadas as amostras de DNA de alto peso molecular, com índice de pureza entre 1,8 – 2,0 e cuja concentração era maior ou igual de 50 ng /µL num volume máximo de 16 µL, ou uma quantidade total maior ou igual de 1 µg de DNA genômico. Quando foi necessário o DNA extraído foi purificado pelo Kit de Lavagem de DNA Genômico WIZARD® (Promega), de acordo com as especificações do fabricante (Figura 3).

3.4 Amostras de DNA controle

Para a seleção das amostras controles, foram quantificadas e avaliadas em gel de agarose 62 amostras de DNA normal, estocadas no Banco de Tumores do Laboratório de Oncologia Pediátrica do HC/FMRP/USP.

Foram selecionadas oito amostras controles, as quais apresentaram alto peso molecular e valores de concentração acima de 100ng/uL (Figura 3).

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA de alto peso molecular. (A) Amostras controles. (B) Amostras neoplásicas (Tu).

3.5 Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

A técnica de CGH foi realizada de acordo com o protocolo padrão descrito por Kallioniemi *et al.* (1992) com algumas recomendações já publicadas (KALLIONIEMI *et al.*,1996), assim como algumas modificações realizadas em nosso laboratório.

3.5.1 Marcação do DNA genômico

Os DNA testes (tumoral) e controles (normal) foram marcados de forma indirecta por *nick-translation* com o Biotin - Nick Translation Mix (Roche®) e Dig - Nick Translation Mix (Roche®), respectivamente. A reação foi realizada

a 15°C durante 25-45 minutos; e posteriormente inativada com EDTA (0,5 mM) a 65°C por 10 minutos. Após a marcação do DNA, o tamanho dos fragmentos foi avaliado em gel de agarose a 1%, sendo selecionadas aqueles DNAs cujos fragmentos resultantes variaram entre 200 –1000 pb. (Figura 4).

Figura 4. Exemplo de eletroforese em gel de agarose 1% após marcação por *nick traslation*. (MP) Marcador de peso molecular de 100pb, (MM 65, 125, 250) Marcadores de massa molecular de 65, 125 e 250 ng.

3.5.2 Precipitação e preparação das sondas

Foram precipitados 150 ng de DNA teste e 150 ng de DNA controle, simultaneamente, com 8 µl de DNA Cot-1 humano (Invitrogen®), 10 µl de Acetato de Sodio (3M) e 350 µl de etanol 100%. Posteriormente, esta mistura

de sondas foi diluída em 17 μ l de uma solução 50% formamida, 10% dextran sulfato, 2X SSC, pH 7,0. A solução foi desnaturada a 75°C.

3.5.3 Preparo das lâminas

As preparações metafásicas foram obtidas de acordo com protocolo padrão a partir de linfócitos de sangue periférico estimulados com fitohemaglutinina desde indivíduos voluntários masculinos e femininos cariotipicamente normais. As laminas foram envelhecidas por 7-10 dias e submetidas à solução de desnaturação (70% formamida/2XSSC pH 7,0) a 75°C, seguido pela desidratação em uma série de etanóis (70, 90 e 100%).

3.5.4 Hibridação

Foram aplicados 17 μ l da solução contendo as sondas sobre a preparação metafásica desnaturada contida na lâmina. A lâmina foi selada e incubada a 37°C por pelo menos 72 horas em câmara úmida.

3.5.5 Lavagem pós hibridação

Depois do tempo de hibridação, o DNA não hibridado foi removido da lâmina realizando lavagens com formamida 50%, 2 X SSC e 4 X SSC/0,1%

Tween 20 a 45°C. Para evitar qualquer ligação inespecífica dos anticorpos foi aplicada uma solução de bloqueio (3% BSA/0,1% Tween-20).

3.5.6 Detecção por Imunofluorescencia

Utilizou-se o procedimento de detecção indireta, contendo as seguintes soluções de haptenos ou anticorpos, marcados por fluorocromos: *Avidin* – FITC (1/1000)(Sigma[®]), *Mouse Monoclonal anti-Digoxigenin* (1/100) (Sigma[®]), *Rabbit anti-mouse* – TRITC (1/100) (Sigma[®]). A contracoloração foi realizada utilizando-se uma solução de DAPI e uma solução para evitar a redução ou perda da intensidade dos sinais fluorescentes (*antifade*).

3.6 Hardware e Software

Para a aquisição das três imagens fluorescentes de CGH por metáfase: contracoloração (DAPI), DNA teste (FITC), e DNA de referencia (TRITC) foi usada uma câmera CCD de alta sensibilidade acoplada a um microscópio de epifluorescência Olympus BX40, o mesmo que dispõe de um conjunto de filtros apropriados para os fluorocromos DAPI, FITC e TRITC. Foi usado um objetivo UPlan FLN (60X/1.25 Oil Iris) sem nenhuma magnificação adicional. Foi utilizado o software CGHView™ EXPO 3.0 (Applied Spectral Imaging) para a análise completa da CGH.

3.7 Análise digital da CGH

3.7.1 Adquisição de imagens.

Para cada amostra foram analisadas no mínimo dez metáfases. As três imagens foram capturadas individualmente, com enfoque manual e tempo de exposição automático para cada imagem. Os filtros foram trocados manualmente de DAPI para FITC para TRITC. As metáfases foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios subjetivos: cromossomos bem dispersos e com bandamento DAPI numa resolução de aproximadamente 400 bandas, hibridação FITC e TRITC homogênea em todos os cromossomos e *background* fluorescente baixo ou nulo.

3.7.2 Cariotipagem da imagem DAPI invertida.

Após um procedimento de realce no contraste das bandas DAPI, foi determinado a posição do centrômero de todos os cromossomos. Cromossomos superpostos e muito curvados foram eliminados manualmente. Os limites e eixos cromossômicos foram detectados automaticamente e corrigidos quando foi necessário. Posteriormente o cariótipo foi gerado e corrigido manualmente.

3.7.3 Verificação das imagens de fluorescência e Geração dos perfis-razão.

As imagens FITC (verde) e TRITC (vermelho), e os limites e eixos cromossômicos foram superpostos e exibidos. Foram verificadas e corrigidas as deslocamentos de imagens. Os perfis-razão de todos os cromossomos foram gerados pelo *software*. Ajustes finais foram realizados nos cromossomos (limites, posição de centrômeros, etc.) para a otimização dos perfis.

3.7.4 Intervalo de Referencia Padrão (IRP)

Para o presente estudo, o IRP utilizado foi obtido a partir da análise com CGH de 10 amostras de DNA de alto peso molecular de 10 indivíduos normais escolhidos do Banco de DNA do Laboratório de Oncologia Pediátrica – HCFMRP. Para o IRP foi considerado um intervalo de confiança de 99,5% sobre o desvio padrão da média dos perfis desta “biblioteca controle” (dados não apresentados). A detecção de alterações cromossômicas nas amostras de OS (ganhos e perdas) foi definido quando o média dos perfis-razão de cada caso cruza o limiar dinâmico do IRP. Ao mesmo tempo, o sistema gerou barras das cores verde e vermelha, à direita e esquerda de cada ideograma cromossômico, para sinalizar as regiões de ganho e perda respectivamente em cada caso analisado.

4. RESULTADOS

Os dados de microdissecção são apresentados na Tabela 1. Foram selecionadas 17 amostras por serem consideradas representativas de tumor; os índices de celularidade variaram de 20 – 90% entre todas as amostras avaliadas.

Após microdissecção, foi realizada a extração de DNA das 17 amostras seleccionadas, os resultados da extração são apresentados na Tabela 2. Nove amostras de DNA alcançaram os critérios de inclusão de qualidade, pureza e concentração (Tabela 2, Figura 3), sendo que 3 foram excluídas por apresentar degradação evidente e/ou índices de pureza deficientes; e 5 amostras foram excluídas da análise por não atingir o nível de concentração mínimo (63 ng/μL ou 1μg em 16μL). Esta baixa concentração se relaciona diretamente com os baixos índices de celularidade observados.

TABELA 2. Seleção de amostras após quantificação e avaliação de qualidade do DNA.

Nº	Amostra (Tu)	Celularidade (%)	Concentração (ng/μL)	Qualidade	Seleção
1	146	40	466	I	Não
2	156	90	152	A	Sim
3	214	ND	62	A	Sim
4	220	ND	202	A	Sim
5	229	40	< de 20	A	Não
6	419	40	< de 20	A	Não
7	431	30	< de 20	A	Não
8	480	90	440	I	Não

9	507	80	170	I	Não
10	532	20	< de 20	A	Não
11	590	ND	44	A	Não
12	735	70	80	A	Sim
13	856	40	70	A	Sim
14	1022	90	178	A	Sim
15	1024	50	86	A	Sim
16	1169	50	54	A	Sim
17	1206	70	152	A	Sim

ND, não determinado; I, inadequado; A adequado

As nove amostras selecionadas tiveram como mínimo 50% de celularidade, DNA com qualidade preservada, índices de pureza entre 1,7 e 2,0 e concentração superior de 50ng/μL.

As nove amostras são provenientes de 6 pacientes pediátricos com diagnóstico de OS com idades entre 13 e 18 anos de idade, dos quais 4 são do sexo feminino e 2 do sexo masculino. As informações clinico-patológicas dos pacientes são mostradas na Tabela 3.

TABELA 3. Dados clinico-patológicos dos nossos nove pacientes

Tumor	Idade/Sexo	Local do Tumor	Material tumoral	Resultados histológicos
Tu 156	15/M	Fêmur distal	Amputação AQ	ND
Tu 214	16/F	Fíbula proximal	Biopsia	ND
Tu 229 ^a	17/F	Fíbula	Ressecção AQ	ND

Tu 735	18/M	Fêmur distal	Ressecção AQ	ND
				Tecido fibro-cartilaginoso apresentando focos de calcificação
Tu 856	17/F	Tíbia	Ressecção AQ	com formação de osteoide. Osteoblastos voluminosos, atípicos com hipercromasia nuclear.
				Nódulos compostos de células com citoplasma pouco definido e núcleos pleomórficos e hipercromáticos.
Tu 1022 ^b	18/F	Pulmão	Nódulos metastáticos	
				Lesão mesenquimal com células fusiformes, estreladas com atipias nucleares e formação de osteoide. Notam-se trabéculas ósseas adjacentes, com rima de osteoblastos e eventuais osteoclastos. O estroma do periosteio é denso. Há infiltração medular.
Tu 1024	13/F	Tíbia proximal	Biopsia	
				Células fusiformes pleomórficos com núcleos atípicos, por vezes multinucleados, hipercromáticos e com mitoses atípicas. Citoplasma eusínófilo de limites pouco precisos. Abundante material osteoide com calcificações granulares e irregulares exibindo aspecto condroide.
Tu 1169	11/F	Fêmur	Biopsia	
Tu 1206 ^c	11/F	Fêmur	Ressecção AQ	ND

M, masculino; F, feminino; AQ, após quimioterapia; ND, não descrito.

^a Amostra de ressecção do caso Tu 214.

^b Amostra metastática do caso Tu 856.

^c Amostra de ressecção do caso Tu 1169.

Três pacientes (A,B e C) apresentaram amostras pareadas. As amostras pareadas dos pacientes A (Tu 214, Tu229) e B (Tu 1169, Tu 1206) correspondem à amostra primária (biópsia) e amostra de ressecção após quimioterapia (QT), respectivamente; as amostras pareadas do paciente C (Tu856, Tu 1022) correspondiam-se com a amostra de ressecção AQ e amostra metastática correspondente, respectivamente.

Os resultados de CGH das nove amostras são descritos na Tabela 4 e ilustrados na Figura 5 .

Figura 5. Resumo de todos os ganhos e perdas identificados nos 9 casos de OS analisados. Linhas verticais verdes e vermelhas indicam ganho e perda cromossômica respectivamente. Linhas azuis indicam as regiões mínimas de sobreposição mais comuns.

TABELA 4. Alterações no número de cópias de seqüências de DNA detectadas por CGH em 9 casos de Osteossarcoma.

Tumor		Resultado da CGH
Tu 156		
32 Ganhos		+1p31-q31, +1q41-qter, +2p24-q12, +2q21, +2q24-qter, + 3p13-q21, +4pter-q31.3, +5p14-q12, +5q15q22, +5q32-q34, +6p22, +6p12-q13, +6q16-q22, +7, +8p21-q13, +8q21.3-q23, +9p, +9q22-q33, +10p12-q21, +10q23, +11p, +11q14-q21, +12p12-q21, +13q12, +13q21-qter, +14q11.2-q21, +15q, +16p13.1-q22, +18p11.2-q12, +20pter-q12, +Xpter-q13, +Ypter-q11.2.
23 Perdas		-1p32-pter, -1q32, -2q13-14.3, -2q22-q23, -3p14-p21, -3q22-q26.3, -5q23-q31, -6p21.1-p21.3, -6p24, -9q21, -10q22, -10q24-q25, -11q12-q13, -11q22-q23, -12q21-qter, -13q13-q14, -14q22-q24, -16q22-qter, -17q, -18q21-qter, -19, -20q13.2-qter, -Xq25-q26.
Tu 214		
34 Ganhos		+1p13-p31, +1q21-q22, +1q24-q32, +2, +3p21-qter, +3p13-q21, +3q25-qter, +4, +5p14-q13, +5q21-q23, +6p22-pter, + 6p21.2-qter, +7p, +7q21, +8pter-8q24.1, +9p23-24, +10p11.2-p12, +10q26, +11p14-q23, +12pter-q23, +13q12, +13q21, +13q31-q32, + 14q, +15q11.2-q15, +16p11.2-q22, +17, +18pter-q12, +18q22, +19p13.1-p13.2, +20p11.2, + 21q11.2-q21, +Xp, +Xq21-qter.
12 Perdas		-1p13, -1p31-p35, -3q22-q24, -5q31-q34, -9p22-q31, -10p14-pter, -10q22-q25, -13q13-q14, -15q21-q25, -19q13, -21q22-qter, -22q13.
Tu 229		
39 Ganhos		+1p13, +1p41, +2p11.2-p21, +2q14.2-qter, -3p14-q13.3, +3q26.3-qter, +4, +5p13-q15.2, +5q12, +5q14-q22, +6p22, +6q12-q16, +6q23-q25, +7p21-q21, +7q32-q33, +8p21-22, +8q12-q23, +9p12-p13, +9q34, +10, +11p, +11q13, +11q22, +12p11.2-p12, +12q14-q24.1, +13q12-q14, +13q22-q31, +14q11.2-q12, +14q21, +14q32, +15q21, +15q25-qter, +16p13.1-q13, +17q24, +18,

+20p11.2-qter, +21q11.2-q21, +Xp22.1-q13, +Xq21-q26

20 Perdas -1p21-p36.1, -1q21-q32, -1q44, -2q11.2, -3q25, -3q23-q24, -5q11.2, -5q31-q32, -6p21.3, -7q22-q31, -8p11.2-p12, -9q22-q31, -11q12, -11q14, -14q31, -16q23, -17q11.2-q12, -17q22-q23, -19q13.1, -22q13-qter.

Tu 735

48 Ganhos +1p32, +1p35, +1p36.1-pter, +1q21-q24, +1q31-32, +1q41, +2p13-p14, +2q23, +2q36-37, +3p, +4p12, +4q21-q23, +4q31.2-q35, +5p, +5q13, +5q34-qter, +6p22-pter, +6q24, +7p13-p14, +7q22-qter, +8p21-p23, +8q21.2-q22, +8q24.1, +9p, +9q21-q22, +10p12, +10q21, +11p11.2-p12, +11p15, +12p, +12q21, +13q21-q31, +14q11.2-q21, +14q31-q32, +15q11.2-q13, +15q25-q26, +16p13.2-q13, +16q23-qter, +17p, +18q22, +19p13.2-13.3, +19q13.1-q13.2, +21q, +22q13-qter, +Xp11.2-p22.1, +Xq21, +Xq25-q27, +Ypter-q11.2.

29 Perdas -1p21-p31, -1q32, -2p21, -2q11.2-q13, -2q21, -2q24-q32, -3q13.2-q13.3, -3q26.1-q26.2, -4p15, -4q25-q28, -5q11.2, -5qq14, -5q21, -5q23-31, -6p21.3, -6q12-q14, -6q16, -7q11.2-q21, -8q11.2-q12, -9q31-q34, -10q23-q24, -11q12-13, -11q22, -12q14, -12q21-q22, -15q15, -15q23, -17q23, -Xq12-q13

Tu 856

37 Ganhos +1p12-p33, +1q21-q32, +2p21-p23, +2p13-q14, +2q22, +2q24, +2q32-qter, +3p21-p23, +3p13-q21, +3q23-q27, +4p14-pter, +4q, +5p13, +5q12, 6p11.2-p21, +7q21-q22, +7q32-qter, +8p21, +8q21, +8q23, +9p23, +11p12-p13, +11q14, +12q23, +13q31, +14q21, +14q24-q32, +15q14, +15q25, +16q12.1-q21, +17q12, +17q23-24, +18p11.2, +20p11.2, +21q22, +Xp11.2-q21, +Xq25-q26.

27 Perdas -1p34-p36.3, -2q31, -4p12-p13, -5q11.2, -5q13-q21, -5q31-q34, -6q14-q16, -6q24-q25, -7p21-pter, -7p14-p15, -7p11.2, -9p12-p13, -9q22-qter, -10p12-p13, -10q22, -10q24-q25, -11q23-q25, -12p11.2, -13q12-q14, -15q22, -15q26-qter, -17p11.2-p12, -17q21-22, -17q25, -18q11.2-q12, -22q12-13, -Xq23

Tu 1022

33 Ganhos	+1p13, +1p22-p31, +1q21-22, +1q24-q25, +1q32-q41, +2q14, +2q32-q33, +3p12-q13, +4p15.2-q31.3, +5q21-q23, +5q33, +6q23-q24, +7p11.2-p12, +7p14-p15, +7q21, +8p21-p22, +8p12-q21.3, +8q23, +9p13-p23, +10p11.2-p12, +10q21, +10q24-q25, +11p13-p14, +11q14-q21, +12p11.2-q21, +13q12, +13q21, +13q31, +14q24-q32, +15q21-q23, +15q26, +18q21-q22, +Xq25.
34 Perdas	-1p31-p34, -2p11.2, -2p16-p22, -2p37, -3p21-23, -3q13.3-q24, -3q26, -5p14-p15.2, -5q11.2, -5q13, -5q23-q31, -6p24-p25, -6p21-p22, -7q31-q32, -9q22-q31, -10p14-p15, -11p11.2-p12, -11q13, -11q23-qter, -13q13-q14, -14q11.2-q12, -14q24, -15q13-q14, -16q21-qter, -17p11.2-p12, -17q12-q22, -17q24-q25, -18q11.2-q12, -19, -20q11.2-q13.1, -21q22, -22q12-qter, -Xp11.2-11.4, -Xp22, -Xq21.

Tu 1024

44 Ganhos	+1q21, +1q31-qter, +2p21-p22, +2p11.2-p15, +2q14-q21, +2q35-qter, +3q13.1, +4p14-q13, +4q31.3-q34, +5p12-p15.1, +5q14-q23, +6p23-p25, +6p12-p21.2, +6q12-q13, +6q16, +6q22-q24, +7p11-p13, +7p21-p22, +7q11.2-q21, +7q34-qter, +8p12-p23, +8q12-q23, +9p, +9q21-q22, +10p11.2-p12, +10q23, +11p, +11q14, +11q24-qter, +12p11.2-p12, +12q14-q15, +14q11.2-q21, +14q24, +16p12-q13.3, +16q12.1-q21, +17q25, +18p11.2, +18q12-q22, +20p11.2, +20q11.2, +20q13.1-qter, +21q, +22q11.2-q12, +Xp21-p22.1.
20 Perdas	-1p22-p31, -1p34.2, -2p23-pter, -2q12, -2q31, -3p21-p22, -3q13.3-q24, -3q22-q24, -3q27, -5q31-q32, -7p14-p15, -7q22, -7q32, -10p14-p15, -11q13-14, -13q22-q31, -14q21-q22, -19p13.2-qter, -Xq12-q13, Xq22-q24

Tu 1169

24 Ganhos	+2p13-p14, +2q22-q24, +2q37, +4q21-q22, +4q32-q35, +5p13-p14, +5q21-q23, +5q31-qter, +6q22, +7q22-q36, +8p22-pter, +9q31-33, +10p12, +10q11.2, +10q22-q26, +13q31, +15q15-q21, +16p, +17p13, +18q21, +18q23, +19q13.1-13.2, +21q22, +22q13.
-----------	---

33 Perdas	-1p36.2, -1p34-q32, -2p12-q21, -2q23-q24, -3p21-p24, -3p12, -3q13.1-q24, -4p15, -4q25-q26, -4q28, -5q12, -6p21.2-p22, -6p24-p25, -7p15, -7q11.2-q22, -8q11.2, -8q21, -9p12, -9q13-q21, -10q21, -11p14-q23, -12p12, -12q12-q14, -13q12-q14, -14q12, -14q21-q24, -15q21-q22, -16q22, -17q11.2-q24, -18q11.2, -20q13.1-q13.2, -Xq13, -Xq25-q26.
-----------	--

Tu1206

22 Ganhos	+1p22, +1p36, +1q25-q31, +1q42, +2q32, +2q35-qter, +3p21-pter, +3q26.3-q27, +6p, +6q14-q21, +6q22, +8p22-p23, +10p13-p14, +11p14-p15, +14q12-q13, +16p12-pter, +17p12, +17q25, +18p11.2-p11.3, +21q11.2-q21, +22q13, +Xp22.1-p22.2.
28 Perdas	-1p31, -1p34, -1q21-q22, -1q32, -2p23-q31, -3p21, -3q13-q24, -4p15-q24, -4q28-q31, -5p14-q33, -7p15-q22, -8p12-q22, -9p12-p13, -9p21-p33, -10p11.2-q23, -11q12-q23, -12p12-q15, -12q21-q24.1, -13q12, -13q14-q31, -14q21-q24, -15q11.2-q24, -16q21-q22, -17p11.2, -17q21-q22, -18q11.2-q21, -20q11.2-q13.2, -Xp21-q26.

Alterações no número de cópias de DNA foram detectados na totalidade dos casos e em todos os cromossomos. No presente estudo foi encontrado um total de 539 alterações cromossômicas, com uma média de $59,9 \pm 8,8$ alterações por caso em uma faixa de 46-77 alterações. Os ganhos (média $34,8 \pm 7,9$; entre 22-48) foram mais frequentes que as perdas (média $25,1 \pm 6,6$; entre 12-34). De modo geral, os ganhos e perdas correspondem-se com 58 e 42% de todas as alterações descritas respectivamente, resultando numa razão ganho: perda de 1,38 : 1.

Os ganhos mais frequentes ocorreram nos cromossomos 1q (8/9, 89%), 2p (7/9, 78%), 2q (9/9, 100%), 3p(7/9, 78%), 4p (7/9, 78%), 4q (8/9, 89%), 5p (7/9, 78%), 5q (8/9, 89%), 6 (7/9, 78%), 7 (7/9, 78%) , 8p (9/9, 100%), 8q (7/9, 78%), 11p (8/9, 89%), 14q (8/9, 89%), 16 (7/9, 78%), 21q (7/9, 78%) e X (7/9, 78%); e perdas nos braços cromossômicos 1p (9/9, 100%), 2q (8/9, 89%), 3q (8/9, 89%), 5q (9/9, 100%), 9q(8/9, 89%), 11q (8/9, 89%) e 17q (7/9, 78%). Nos casos Tu 156 e Tu 735 (pacientes de sexo masculino), se detectou ganho de Yp11.2-q11.2. As regiões mínimas de sobreposição são apresentadas na Tabela 5.

TABELA 5. Regiões mínimas de sobreposição mais frequentes em 9 osteossarcomas analisados por CGH

Regiões mínimas de sobreposição	Frequência
Ganhos	
2p13-p14, 2q36-q37, 4q21, 8p22	7/9 (78%)
1q21, 2q32, 3p12-q13.1, 4q12-q13, 4q22-q23, 4q31.3, 5p13-p14, 7p21, 8q21.2-q21.3, 12p11.2, 16p12, 16q12-q13	6/9 (67%)
1q24-q25, 1q31, 2p12, 2q24, 2q35, 4p12-p14, 4q24-q28, 4q32-q34, 5q22-q23, 6q16, 7p11.2-p13, 7q32, 7q34-q35, 8p21, 8q12-q13, 8q23, 9p23-p24, 10q11.2-q12, 11p11.2-p14, 12p12, 13q31, 14q11.2-q21, 14q32, 16p13.1-p13.2, 18p11.2-p11.3, 18q22, 20p11.2, 21q11.2-21, Xp11.2, Xp21-p22.1	5/9 (56%)

Perdas

3q24	7/9 (78%)
1p34.2, 3q22-q23	6/9 (67%)
1p31, 3q21, 5q31, 9q22-q31, 11q13, 13q13-q14, 17q21-q22, 19q13.1	5/9 (56%)
1p32-p34.1, 1q32, 2q11.2-q12, 3q21, 3q13.3, 7q22, 11q12, 11q23, 13q13, 14q22-q24, 15q22-q24, 17q12-q21, 19q13.2, 22q13, Xq13,	4/9 (44%)

Em quanto à análise de CGH nas amostras pareadas, foram encontradas alterações cromossômicas compartilhadas, ou seja que estão presentes nas duas amostras do mesmo paciente.

Alterações compartilhadas foram encontradas nos 3 pacientes. As amostras pareadas dos pacientes A e B apresentaram o mesmo número de alterações compartilhadas (37), as frequências dessas alterações em cada caso foram 54 e 50% respectivamente.

O paciente C apresentou o maior número de alterações não compartilhadas (85), com uma frequência de 79% entre as suas amostras pareadas.

Das 249 alterações diferentes encontradas nos 3 pacientes, 152 (61%) correspondem a alterações não compartilhadas, ou seja, que não estiveram presentes simultaneamente nas duas amostras do mesmo caso. Dessas 152 alterações não compartilhadas, 85 (56%) ocorreram nas amostras do paciente C.

As regiões cromossômicas que apresentaram alterações compartilhadas e não compartilhadas por caso são apresentadas na Tabela 6.

TABELA 6. Correspondência de alterações citogenéticas entre as amostras pareadas.

<i>Regiões com alterações cromossômicas compartilhadas por caso</i>	
Paciente A	Ganhos: +2, +3, +4, +5, +6, +7p, +8p, +11, +12, +16, +18, +20p, +21, +X. Perdas: -3q, -5q, -19q, -22q.
Paciente B	Ganhos: +2q, +8p, +16p, +17p, +22q. Perdas: -2, -3q, -4p, -7, -8q, -11q, -12, -13q, -14q, -15q, -16q, -20q, -Xq.
Paciente C	Ganhos: +1q, +3p, +4q, +8p, +8q, +11q, +13q, +14q, +Xq. Perdas: -5q, -9q, -11q, -13q, -17, -18q, -22q.
<i>Cromossomos ou regiões cromossômicas com alterações não compartilhadas por caso</i>	
Paciente A	<u>1</u> , 7q, <u>9</u> , <u>10q</u> , 13q, <u>15q</u> , 16q, 17q, 20q.
Paciente B	<u>1</u> , 2q, 3q, 5q, <u>9q</u> , <u>10q</u> , <u>15q</u> , 18q, 21q.
Paciente C	<u>1p</u> , 2, 3, 5, 6, 7, <u>9p</u> , <u>10p</u> , 11q, 12q, <u>15q</u> , 16q, 18q, 19, 20q, 21q, Xp

No paciente A (amostras Tu 214 e Tu 229), ocorreram 37 alterações compartilhadas, principalmente ganhos nos cromossomos 2, 3, 4, 5, 6, 7p, 8q, 11, 12, 16, 18, 20p, 21, X e perdas de 3q, 5q, 19q, 22q. No mesmo paciente, 31 alterações não foram compartilhadas entre a amostra de biopsia e a amostra de ressecção, acometendo principalmente os cromossomos 1, 7, 9, 10q, 13q, 15q, 16q, 17q, 20q (Figura 6). As alterações citogenéticas não compartilhadas mais relevantes que se apresentaram após o tratamento QT foram as que aconteceram no cromossomo 1, com 5 ganhos e 3 perdas na

amostra primaria *versus* 2 ganhos e 5 perdas na amostra de ressecção. Perdas em 10q, 13q13q14 e 15q21-q24 na amostra primaria *versus* ganhos em 10q, 13q12q13, 15q21e 15q25, após tratamento. O ganho em todo o cromossomo 17 na amostra primaria *versus* duas perdas isoladas no 17q após QT. Perda em 7q22-q31 e ganho em 7q32-q33 apareceram como novas alterações reveladas após tratamento.

Figura 6. Resumo das principais alterações compartilhadas nas amostras do paciente A. As linhas verticais verdes e vermelhas correspondem a ganhos e perdas, respectivamente. As linhas internas e externas correspondem às alterações detectadas na amostra de biópsia e de ressecção, respectivamente.

No paciente B (amostras Tu 1129 e Tu 1206), 37 alterações cromossômicas foram compartilhadas entre as duas amostras, entre elas, ganhos em 2q, 8p, 16p, 17p, e 22q, e perdas em 2, 3q, 4p, 7, 8q, 11q, 12, 13q, 14q, 15q, 16q, 20q e Xq (Figura 7).

Figura 7. Resumo das principais alterações compartilhadas nas amostras do paciente B. As linhas verticais verdes e vermelhas correspondem a ganhos e perdas, respectivamente. As linhas internas e externas correspondem às alterações detectadas na amostra de biópsia e de ressecção, respectivamente.

Por outro lado, 46 alterações citogenéticas não foram compartilhadas, e aconteceram principalmente nos cromossomos 1, 2q, 3q, 5q, 9q, 10q, 15q, 18q, 21q. Especificamente, perdas em 1p, 1q, 3q21-q23, 6p21.2-pter na biópsia *versus* ganhos em 1p, 1q, 3q21-qter, 6p, 6q14-q22 após QT. Também variaram os ganhos em 2q22-q24, 5q, 9q31-q33, 10q, 15q15, 18q21, 21q22 na biópsia *versus* perdas em 2q22-q24, 5q, 9q21q33, 10q, 15q, 18q e 21q22 após tratamento. Ganhos de 3q26.3-q27, 6q14-q21 e perda em 12q21-q24 surgiram como novas alterações após tratamento QT.

No paciente C (amostras Tu 856 e Tu 1022), foram compartilhadas 23 alterações citogenéticas entre a amostra de ressecção e a amostra metastática correspondente, entre elas, ganhos em 1q, 3p12-q13, 4q, 8p, 8q,

11p13p14, 11q14, 13q31, 14q31-q32, Xq24-q25 e perdas em 5q, 9q, 11q23-q24, 13q13-q14, 17, 18q11.2-q12, 22q12-q13 (Figura 8).

Figura 8. Resumo das principais alterações compartilhadas nas amostras do paciente C. As linhas verticais verdes e vermelhas correspondem a ganhos e perdas, respectivamente. As linhas internas e externas correspondem às alterações detectadas na amostra de ressecção e metástase, respectivamente.

Por outro lado, revelaram-se 85 alterações citogenéticas não compartilhadas. Entre elas, ganhos e perdas em diferentes regiões dos cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 7. Também ganhos em 6q, 9p, 10p, 12q, 15q, 18q, e perdas em 5p, 11q, 16q, 19, 20q, 21q, Xp ocorreram como novas alterações na amostra metastática.

5. DISCUSSÃO

OS é caracterizado por apresentar rearranjos cromossômicos complexos tais como cromossomos marcadores múltiplos, *double minutes* (dm), regiões homogeneamente coradas (hsr) e/ou varias alterações de ploidia (BOEHM *et al*, 2000). Os rearranjos cromossômicos não balanceados tem sido definidos como essenciais e predominantes na patogênese de tumores sólidos como o OS (MITELMAN *et al*, 1997b). Além disso, a CGH é considerada uma metodologia ideal para a análise de alterações cromossômicas não balanceadas neste tipo de tumor (OZAKI *et al*, 2003).

Na nossa experiência, a CGH é uma metodologia laboriosa contendo vários aspectos críticos a serem observados na realização dos experimentos.

O processo de microdissecção mostrou ser muito importante na seleção de amostras, tanto pela exclusão de amostras não representativas de neoplasia como pela obtenção do índice de celularidade das amostras microdissecçadas. Diversos autores recomendam a inclusão de amostras previamente microdissecçadas na análise de CGH para descartar possíveis erros de contaminação e falsa interpretação de resultados.

A validade desse procedimento em nosso estudo foi confirmado posteriormente com os resultados da qualidade e quantificação dos DNA extraídos. É necessário mencionar que só três estudos prévios de CGH em OS tem descrito a utilização da microdissecção como passo prévio à extração de DNA (TARKKANEN *et al.*, 1999; OZAKI *et al.*, 2002; BARUFFI *et al.*, 2003). Em nosso estudo, o procedimento de microdissecção excluiu 6 amostras que não eram representativas de tecido neoplásico (necrose, fibrose, etc.),

amostras que se incluídas no estudo, poderiam alterar nossos resultados com falsos positivos.

A extração de DNA, mesmo nas amostras microdissecadas com baixos índices de celularidade, permitiu confirmar os resultados da microdissecção. Todas as amostras que posteriormente foram excluídas devido a sua baixa concentração de DNA, correspondiam a com amostras que apresentaram entre 20–40% de celularidade e/ou qualidade no gel de agarose inadequada.

Como descrito por Rogatto (2000), a segurança e sensibilidade desta metodologia é estritamente dependente da homogeneidade das amostras de DNA isoladas. Em nosso estudo, 9 amostras conseguiram cumprir os critérios de homogeneidade que a própria metodologia demanda.

Analises de CGH de OS têm sido publicados por vários grupos (TARKKANEN *et al.*, 1995, 1999; FORUS *et al.*, 1995b; STOCK *et al.*, 2000; ZIELENSKA *et al.*, 2001; OZAKI *et al.*, 2002; BATANIAN *et al.*, 2002; BARUFFI *et al.*, 2003; OVERHOLTZER *et al.*, 2003; LAU *et al.*, 2004; OHATA *et al.*, 2006; AGUIAR *et al.*, 2007); apesar disso, não existe um consenso entre os seus resultados, sendo recomendável a realização de mais estudos para determinar com maior precisão as regiões cromossômicas diretamente envolvidas com o desenvolvimento do OS.

Ozaki *et al.*, 2002 estudaram 41 casos de OS pela CGH, a média de alterações citogenéticas por tumor foi de 16, 1; e a razão ganho:perda foi de 1.3 : 1. Tarkkanen *et al.*, 1999, encontraram uma media de 9,6 alterações por

tumor em 31 casos de OS estudados pela CGH, com uma razão ganho:perda de 1,9 : 1. Outro estudo realizado com 18 casos de OS descreveu uma media de 4,7 alterações cromossômicas por tumor e uma razão ganho:perda 2,7 : 1 (ZIELENSKA, *et al.*, 2001).

Em comparação com esses estudos, nossa investigação revelou o número maior de alterações genéticas não balanceadas por tumor ($59,9 \pm 8,8$). O número alto de alterações detectadas está relacionado diretamente com o método de detecção utilizado (Intervalo de Referencia Padrão), o mesmo que aumentou significativamente a sensibilidade e especificidade da técnica em comparação com o uso de limiares fixos (estudos pilotos, dados não mostrados).

Atualmente o critério de detecção de alterações cromossômicas mais comum, descrito nos diversos estudos de CGH em OS, é baseado na comparação da media dos perfis de uma região cromossômica com limiares (superior ou inferior) previamente determinados ou fixos (0,80 e 1,20, por exemplo). Apesar de ser o critério mais utilizado, nenhum autor explica o motivo dessa eleição metodológica. A utilização de limiares fixos na análise de CGH, tem a desvantagem de excluir alterações no número de cópias que estejam por baixo dos valores fixos predeterminados, produzindo dessa forma resultados falsos negativos (KIRCHHOFF *et al.*, 1998).

Foi observado que a utilização de um IRP como critério de detecção, diminuiu os problemas de falsos positivos e falsos negativos na análise de CGH, aumentando significativamente a sensibilidade e

especificidade da técnica, assim como também permitindo a análise de regiões previamente excluídas pela utilização de limiares fixos (KIRCHHOFF et al., 1998, 1999).

O IRP é obtido a partir da análise de CGH de DNA teste normal (amostras normais versus amostras normais). Em teoria, quando são co-hibridadas duas amostras de DNA normal, a razão de intensidades de fluorescência resultante deve ser 1.0; mas isso nem sempre acontece (KALLIONIEMI *et al.*, 1994) e o perfil-razão de hibridações com DNA teste normal algumas vezes desvia-se de 1.0. Esses desvios aparecem seguindo um determinado padrão ao longo dos cromossomos, e algumas regiões cromossômicas apresentam desvios significativos de 1.0, como por exemplo, a metade distal do cromossomo 1p, cromossomo 19 e 22, assim como também muitas regiões teloméricas.

Kirchhoff et al. (1998) definiram a media das razões de amostras normais como o Intervalo de Referência Padrão (IRP) utilizado nos seus experimentos, e desenvolveram um método estatístico baseado na comparação das medias de razões de amostras teste com o IRP correspondente. Os resultados desse estudo, assim como do nosso, demonstraram que a utilização deste critério de detecção (IRP) gera uma maior especificidade e sensibilidade da metodologia, quando comparados com os resultados obtidos a partir de limiares fixos.

No presente estudo, a razão dos ganhos sobre as perdas foi de 1,38 : 1. Esta superioridade de ganhos se corresponde com o descrito na maioria dos

estudos publicados na literatura; seis grupos diferentes, incluindo-nos, tem descrito o mesmo padrão (TARKKANEN *et al.*, 1995; STOCK *et al.*, 2000; ZIELENSKA *et al.*, 2001; OZAKI *et al.*, 2002; BATANIAN *et al.*, 2002) (Tabela 7). Nosso valor da razão ganho:perda aproximou-se mais com o estudo realizado por Ozaki *et al.*, 2002.

5.1 Alterações Cromossômicas Mais Frequentes.

Muitos desequilíbrios genômicos, detectados pela CGH, são descritos na literatura. Uma revisão bibliográfica, incluindo 12 estudos de CGH em OS, é resumida na Tabela 7. As alterações mais comuns foram ganhos em 1p, 8q, 1q, 6p, 1p, 4q, 5p e perdas em 10p, 2q, 6q e 10q (TARKKANEN *et al.*, 1995, 1999; FORUS *et al.*, 1995b; STOCK *et al.*, 2000; ZIELENSKA *et al.*, 2001; OZAKI *et al.*, 2002; BATANIAN *et al.*, 2002; BARUFFI *et al.*, 2003; OVERHOLTZER *et al.*, 2003; LAU *et al.*, 2004; OHATA *et al.*, 2006; AGUIAR *et al.*, 2007).

Nossos resultados de CGH mostram que o OS é uma neoplasia geneticamente muito complexa. Entretanto, apesar da complexidade das alterações cromossômicas encontradas e a heterogeneidade das nossas amostras (3 biopsias, 5 ressecção AQ e 1 metástase), pode ser observada uma tendência na formação de “clusters” ou agrupamentos de alterações citogenéticas.

Evidentemente, muitas das diferenças de frequências entre nosso estudo e os realizados anteriormente por outros autores são provavelmente

devidas ao número pequeno de amostras, assim como ao nosso método de detecção utilizado.

Os ganhos mais freqüentes foram detectados nos cromossomos 1q (89%), 2p (78%), 2q (100%), 3p(78%), 4p (78%), 4q (89%), 5p (78%), 5q (89%), 6 (78%), 7 (78%) , 8p (100%), 8q (78%), 10p (67%), 11p (89%), 12q (78%), 13q21-q31 (67%), 14q (89%), 16 (78%), 18 (67%), 20p (56%), 21q (78%) e X (78%); e as perdas nas regiões cromossômicas 1p (100%), 2q (89%), 3q (89%), 5q (100%), 9q(89%), 11q (89%), 13q13-q14 (67%), 17q (78%) e 19q(56%). Os ganhos no cromossomo 2 e 8, e perdas em 1p e 5q foram alterações citogenéticas que se apresentaram em 100% das amostras.

As regiões mínimas de sobreposição mais freqüentes foram os em 2p13p14, 2q36-37, 4q21, 8p22 para ganhos e 1p34.2, 3q22-q23 e q24 para perdas.

Cromossomo 1

Trissomia do cromossomo 1 e rearranjos estruturais nas bandas cromossômicas 1p11-p13, 1q11-q12 e 1q21-q22 pertencem ao grupo de alterações citogenéticas, descritas com técnicas de citogenética clássica, mais comumente observadas em OS (LÓPEZ-GINÉS *et al.*, 1996; BRIDGE *et al.*, 1997; BOEHM *et al.*, 2000; SANDBERG *et al.*, 2003).

Diversos autores têm descrito ganhos freqüentes no cromossomo 1 detectados pela técnica de CGH; porém, algumas divergências podem ser

encontradas. Tarkkanen *et al.* (1995, 1999) descreveram o ganho no braço longo do cromossomo 1 como a alteração mais freqüente, principalmente em 1q21(58%). Zielenska *et al.* (2001), por outro lado, encontraram ganhos em 1p (59%), preferencialmente em 1p35-p36 (8 casos). Similarmente, Stock *et al.* (2000) determinaram ganhos freqüentes em 1p (50%) e Ozaki *et al.*, (2002) encontraram uma freqüência alta de ganhos nos dois braços do cromossomo 1.

Essas diferenças no perfil genético do cromossomo 1, observado por diferentes autores, refletem a heterogeneidade genômica tão característica desta neoplasia. Assim, no presente estudo, encontramos muitas alterações em diversas regiões do braço 1p; mas, apesar dessa complexidade, as perdas no braço 1p foram mais freqüentes do que os ganhos (100% e 78% dos casos, respectivamente).

Estudos de FISH em linhagens celulares humanas de OS, usando sondas para 1p e 17p, demonstraram que as perdas em 1p poderiam estar associadas com a patogênese do OS, devido à alta taxa de deleções em 1p36 (MURATA *et al.*, 1998, 1999). Estudos de perda de heterozigosidade (LOH) sugerem a presença de genes supressores de tumores em 1p em diversos tumores, incluindo OS (SCHWAB *et al.*, 1996). Deleções em 1p são as alterações mais freqüentes em neuroblastoma e geralmente são associadas com mau prognóstico (THORNER *et al.*, 1998).

Genes supressores candidatos específicos para OS em 1p são atualmente desconhecidos. Os genes supressores candidatos mais

relevantes descritos em 1p para outras neoplasias são *MTS1/SA1/TFS1* (1pter-p22.1; supressor de transformação maligna 1), *ID3* (1p36.13-p36.12; inibidor de união ao DNA 3), *NB/ NBS* (1p36.13-p36.11; supressor de neuroblastoma), *TNFR2* (1p36.3-p36.2; receptor do fator de necrose tumoral 2), *DAN* (1p36.13-p36.11; *differential-screening-selected gene aberrant in neuroblastoma*), *CDC2L1* (1p36; *cell division cycle 2-like 1*), *MOM1/PLASG2* (1p35; fosfolipase A2), e *BRCD2* (1p36; supressor de câncer de mama 2). Além desses, recentemente foi descrito o gene *P73*, mapeado em 1p36, o qual apresenta uma considerável homologia com o supressor tumoral *TP53*. (KNUUTILA *et al.*, 1999).

Para o presente estudo, possíveis candidatos de genes supressores de tumor poderiam estar presentes nas regiões mínimas de sobreposição em 1p34.2 (67%) e 1p31 (56%). Cabe ressaltar que a perda da região 1p34.2 foi observada em 7 dos 9 casos estudados, incluindo todos os 3 casos de amostras primárias (biópsias), nenhum ganho foi encontrado nesta região. Com respeito ao braço longo do cromossomo 1, detectamos incremento no número de cópias de DNA em 89% dos casos, especificamente na região 1q21 (67%), concordante com os resultados de Tarkkanen *et al.*, (1995, 1999) e Forus *et al.*, (1995b).

Tarkkanen *et al.* (1995) determinaram a região comum de ganho em 1q21-q31 e subsequente Forus *et al.* (1995b) encontraram incremento no número de cópias na região mínima em 1q21-q23. Posteriormente, Tarkkanen *et al.* (1999) detectaram que além de ser a alteração mais

freqüente em OS (58%), os pacientes portadores de ganhos em 1q21 apresentaram uma tendência para uma menor sobrevida livre de eventos. Contrariamente, Ozaki *et al.* (2002) encontraram prognóstico favorável nos pacientes que apresentavam simultaneamente ganho em 1q21 e perda em 5q. Incrementos no número de cópias de 1q21 são também freqüentes em outros tipos de sarcomas (ARMENGOL *et al.*, 1997; LARRAMENDY *et al.*, 1997a,b).

A região 1q21-q22 inclui genes da família S100 de proteínas ligadas a cálcio (*S100A1*, *A4* e *A6* em 1q21), proteína rica em prolina 3 pequena (*SPRR3*; 1q21-q22) e catepsinas S e K (*CTSS* e *CTSK*, respectivamente; 1q21-q22) (KNUUTILA *et al.*, 1998). Análises moleculares da amplificação 1q em sarcomas humanos revelou que *FLG*, *NTRK1* e *SPRR3*, localizados em 1q21, foram os genes mais freqüentemente amplificados (FORUS *et al.*, 1996). Futuras investigações aprofundariam os conhecimentos ao respeito dessas alterações e sua relação com a oncogênese do OS.

Cromossomo 2

Na literatura, as alterações do cromossomo 2 detectadas pela CGH em OS são divergentes. Embora alguns autores tenham encontrado ganhos nesse cromossomo, essas alterações não são descritas freqüentemente. Stock *et al.* (2000), encontraram ganhos no braço longo do cromossomo 2 em 5 de 16 casos primários estudados, e ganho em 2p11-16 e 2q21-22 em

uma de 5 linhagens celulares correspondentes. Ozaki *et al.* (2003) encontraram ganhos no braço longo do cromossomo 2 em 4 de 8 linhagens celulares humanas de OS. Batanian *et al.* (2002), descreveram ganho em 2q24-qter em 1 de 4 casos de OS pediátricos estudados. Tarkkanen *et al.* (1995, 1999) encontraram ganho em diversas regiões do cromossomo 2 em 8 de 31 casos de OS estudados pela CGH. Um único estudo descreve alta frequência de ganhos no cromossomo 2 (61%), especificamente no braço curto (2p), numa população brasileira com 41 casos de OS (AGUIAR *et al.*, 2007).

Nossos resultados demonstram diversos ganhos nos dois braços do cromossomo 2, principalmente no braço longo, onde o 100% das amostras apresentam essa alteração. Entretanto, algumas perdas dispersas também são observadas, da mesma maneira que alguns autores tem descrito. Tarkkanen *et al.*, (1995, 1999) e Zielenska *et al.*, (2001), descreveram perdas em 2q em 6 (19%) e 3 casos (18%) de OS respectivamente.

Tanto quando consideramos somente as amostras primarias (biópsias) ou quando consideramos a totalidade das amostras, os ganhos no cromossomo 2 são sempre mais frequentes que as perdas. Isto poderia indicar um papel importante dessas alterações no processo neoplásico ainda a ser explorado, principalmente nas duas regiões mínimas de sobreposição encontradas em 2p13-p14 (78%) e 2q36-q37 (78%). Além disso, consideramos de interesse a região 2q33-q36, onde somente foram observados ganhos e nenhuma perda foi registrada. Alguns genes que se

encontram localizados nessas regiões de interesse são *REL* (2p13-p12), *HER4* (2q13), e *PAX3* (2q35), sendo que atualmente não existem relatos na literatura de sua associação com o desenvolvimento de OS; porém, existem descrições que relacionam a expressão desses genes em outras neoplasias.

Rearranjos ou amplificações do gene *REL*, localizado em 2p13-p12, tem sido observados em linfomas, incluindo linfomas não-Hodgkin. A proteína REL forma parte de um complexo chamado originalmente NF- κ B, o mesmo que funciona como um fator de transcrição amplamente expresso em diferentes tipos celulares (citado por HESKETH, 1997).

O gene *HER4*, localizado em 2q13, é expresso em uma variedade de adenocarcinomas mamários e linhagens celulares de neuroblastomas. A expressão incrementada de *HER4* (e de outros membros da família *EGFR*) tem sido descrita em carcinomas papilares de tiróides (citado por HESKETH, 1997).

Outro gene candidato é o gene *PAX3*, localizado em 2q35, codifica um fator de transcrição que ativa genes alvos específicos importantes no desenvolvimento do sistema nervoso humano e principalmente durante a diferenciação das células da musculatura esquelética (VAYEGO *et al*, 1998).

Cromossomo 3

Poucos estudos em OS tem descrito alterações no cromossomo 3. Nossa investigação determinou perdas de regiões de 3q em 8 dos 9 casos

analisados. Sendo de interesse as regiões mínimas de sobreposição em 3q24 (78%) e sua região adjacente 3q22-q23 (67%). Análises com CGH têm descrito perdas de 3q em 2 de 4 casos analisados (BATANIAN *et al.*, 2002) e outra análise tem detectado perdas principalmente em 3p (LAU *et al.*, 2004). Um estudo realizado com sarcomas secundários à radiação determinou presença de freqüentes rearranjos estruturais em 3p pela citogenética clássica; porém, nenhuma perda foi detectada nessa região utilizando CGH (MERTENS *et al.*, 2000). Kruzelock *et al.* (1997), através de análises de LOH, definiram um importante candidato de gene supressor tumoral de OS localizado em 3q26.2.

Cromossomo 4

Em nosso estudo encontramos ganhos em 4p e 4q numa freqüência de 78 e 89% respectivamente. Nossas freqüências são similares com as relatadas por Ohata *et al.*, (2006); sendo de interesse a região mínima de sobreposição detectada em 4q21 (78%).

Quatro estudos diferentes têm descrito o ganho do cromossomo 4 como uma das alterações mais freqüentes, além disso, nenhum estudo tem descrito perdas freqüentes nesse cromossomo. Ohata *et al.*, (2006) determinaram que os ganhos em 4p e 4q foram as alterações cromossômicas mais freqüentes entre as 12 amostras de OS analisadas com CGH (10/12, 83%). Da mesma forma, Batanian *et al.*, (2002) encontraram

ganho de 4q em 3 de 4 casos analisados, constituindo-se a alteração mais freqüente; no mesmo estudo. Também foram encontradas alterações estruturais no braço cromossômico 4q nos 4 casos analisados com citogenética clássica.

Stock *et al.*, (2000) determinaram o ganho em 4q12-q13 (8 casos) e 4q28-q31 (5 casos) como alterações comuns entre 16 casos analisados. Ganhos de 4q foram referidos em 19 de 41 casos analisados por Ozaki *et al.*, (2002), determinando uma freqüência de 46%.

Ganhos de material cromossômico 4q têm sido descritos também em outras neoplasias como gliomas malignos (SCHRÖCK *et al.*, 1994), melanoma primário cutâneo (BASTIAN *et al.*, 1998), e linhagens celulares de neuroblastomas (VAN ROY *et al.*, 1997).

A região 4q possui vários genes candidatos, incluindo aqueles que codificam interleucinas (IL) 2 e 21 em 4q26-27, ciclina A em 4q27, e o cassete de união do ATP em 4q31. Segundo Batanian *et al.* (2002), as alterações de 4q poderiam corresponder a um grupo peculiar de rearranjos cromossômicos, mais freqüentes e específicos de tumores pediátricos do que adultos. Esta afirmação é controversa devido ao reduzido número de casos avaliados (4). Estudos adicionais com um maior número de pacientes são necessários para confirmar estas hipóteses, assim como também para determinar a relação entre esses resultados e o desenvolvimento de OS.

Cromossomo 5

Ganhos em 5p e perdas em 5q são alterações comuns em OS. Zielenska *et al.* (2001) determinaram ganhos em 5p em 18% dos casos analisados. Overholtzer *et al.* (2003) encontraram ganho em 5p13-cen em 30% dos OS estudados com CGH. Ozaki *et al.* (2002) determinaram ganhos em 5p13-p14 em 39% dos casos. Stock *et al.* (2000) determinaram ganhos de 5p13-p14 em aproximadamente 44% dos casos. Nosso estudo revelou principalmente ganhos no braço cromossômico 5p (78% dos casos analisados), especificamente na região 5p13-p14 (67%), concordando com os resultados de Stock *et al.* (2000) e Ozaki *et al.* (2002). Em nosso estudo foram encontradas somente duas perdas nesse braço cromossômico. Os ganhos de 5p tem sido detectados também em outras neoplasias como histiocitoma fibroso maligno (LARRAMENDY *et al.*, 1997a), câncer de mama (TIRKKONEN *et al.*, 1998) e carcinoma de células renais (GLUKHOVA *et al.*, 1998).

Por outro lado, as alterações encontradas no braço longo do cromossomo 5 foram mais complexas e divergentes. Apesar que todas nossas amostras apresentaram perdas em 5q, também foram detectados vários ganhos nesse braço cromossômico em 89% dos casos. As perdas mais freqüentes correspondem às encontradas na região 5q31 (56%) e os ganhos mais freqüentes aconteceram na região 5q22-q23 (56%).

Ozaki *et al.* (2002), determinaram perdas de 5q em 56% dos casos, e determinaram que essa alteração foi associada com prognóstico favorável. OS pode apresentar predisposição a carregar cópias extras do cromossomo 5; por essa razão, as perdas no braço 5q (e seus oncogenes associados) poderiam participar na taxa de sobrevida positiva observada por Ozaki *et al.* (2002). Considerando que cópias adicionais do cromossomo 5 ou do braço 5q podem resultar em amplificação ou hiperexpressão de oncogenes nessa região, a perda de 5q pode reverter este efeito (OZAKI *et al.*, 2002). Varias linhagens celulares de glioma maligno (LN-18, T98G e U251MG) portadoras de ganhos na região 5q proximal, onde encontram-se a ciclina B1 (*CCNB1*; 5q12) e a ciclina H (*CCNH*; 5q13.3-q14), exibiram índices aumentados de crescimento (WEBER *et al.*, 2001). Outros genes candidatos em 5q incluem a interleucina (IL) 3, *IL4*, *IL5* e *IL9* (todas em 5q31.1), proteínas de adesão como alpha 1 catenina (*CTNNA1*; 5q31), fator de crescimento de fibroblastos (*FGF1*; 5q31), FGF receptor 4 (*FGFR4*; 5q35.1-qter), receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (*PDGFRB*; 5q31-q32) e o fator crescimento transformante beta inducido (*TGFB1*; 5q31) (KNUUTILA *et al.*, 1998). Foi demonstrado que o FGF1 aumenta a expressão da fosfolipase citosólica A2 (*cPLA2*) e (em presença de IL1) aumenta a expressão de prostaglandin-endoperoxidase sintetase 2 (*PTGS2*) e a biosíntese de prostaglandina E2 na linhagem celular de OS humana, MG-63 (LAULEDERKIND *et al.*, 2000).

Cromossomo 8

No presente estudo foram encontrados , respectivamente, ganhos no 8p e 8q em 100 e 78% das amostras avalizadas, principalmente nas regiões comuns de sobreposição 8q21.2-q21.3 (67%), 8p21, 8q12-q13 e 8q23 (56%). Os ganhos em todo o cromossomo 8 ou em todo 8q encontrados na nossa análise concordam com os resultados de outros autores (TARKKANEN *et al.*, 1999; STOCK *et al.*, 2000; ZIELENSKA *et al.*, 2001; OHATA *et al.*, 2006). Entretanto, e em contraste com outros resultados, nosso estudo encontrou a presença de ganhos no braço curto 8p em todas as amostras analisadas. Investigações posteriores poderiam definir melhor a importância dessa região na patogênese do OS, especificamente na região 8p21.

Alterações no número de cópias, rearranjos estruturais e amplificações do cromossomo 8 tem sido observados em OS (FLETCHER *et al.*, 1994; HOOGERWERF *et al.*, 1994; BAYANI *et al.*, 2003), assim como também em outras neoplasias (KNUUTILA *et al.*, 1998). Análises prévias de CGH em OS têm encontrado principalmente ganhos e/ou amplificações em 8q e perdas em 8p (TARKKANEN *et al.*, 1995, 1999; STOCK *et al.*, 2000; ZIELENSKA *et al.*, 2001; OZAKI *et al.*, 2002; OHATA *et al.*, 2006). Contrariamente a isso, os ganhos do cromossomo 8 não são uma das mais proeminentes alterações numéricas observadas pela citogenética clássica em OS. Segundo Sandberg e Bridge (2003), é possível que uma porção de cromossomos marcadores ou *double minutes* (dm), freqüentemente observados nas análises de citogenética

convencional de OS, sejam constituídos de material genômico do cromossomo 8. No mesmo ano da publicação de Sandberg e Bridge, um estudo baseado na utilização SKY e FISH em amostras de OS determinou que a instabilidade citogenética intrínseca em OS produz uma alta frequência de alterações citogenéticas complexas que conduzem a ganhos em 8q23-q24 e 17p11-p13, e rearranjos de 20q (BAYANI *et al.*, 2003), confirmando a hipóteses de Sandberg e Bridge (2003).

Stock *et al.*, (2000), usando CGH e FISH, demonstram a presença de dois loci diferentes em 8q envolvidos na patogênese do OS, um deles localizado em 8q21 e outro localizado mais distalmente em 8q23-q24.1. Do mesmo modo, Baruffi *et al.*, (2003), utilizando as mesmas metodologias, demonstraram a presença de amplificação em 8q23.2 em OS.

A amplificação de 8q, envolvendo ao oncogene *cMYC* e sua região circunjacente em 8q24.1, é freqüentemente associada com eventos desfavoráveis; além disso essa alteração não só tem sido encontrada em OS, mas também descrita em câncer de mama, próstata, pulmão, cólon, cabeça e pescoço, gástrico, leucemia mieloide aguda e tumores cerebrais (NESBIT *et al.*, 1999).

Tarkkanen *et al.* (1999) observaram que pacientes com OS que apresentaram aumento no número de cópias em 8q e/ou 1q21 tinham uma tendência para menor sobrevida. Ozaki *et al.*, (2002) chegaram à mesma conclusão em relação ao prognóstico desfavorável dos pacientes com ganhos em 8q, mas só quando os ganhos em 8q estavam presentes em

combinação com perdas em 13q14. Em contraste, Stock *et al.* (2000) observaram em 16 casos de OS, que o número de cópias em 8q e 1q21 não tinham impacto desfavorável no prognóstico.

Além do gene cMYC, e considerando a região 8q23-q24.1 descrita por Stock *et al.*, (2000), podem ser considerados dois genes, osteoprotegerin e da proteína morfogenética *BMP1*, como candidatos potenciais na patogênese do OS, pois os dois genes cumpririam uma função reguladora na formação óssea (TABAS *et al.*, 1991; SIMONET *et al.*, 1997).

Cromossomo 13

A citogenética clássica tem descrito a monossomia parcial ou completa de 13q como uma alteração freqüente em OS (BRIDGE *et al.*, 1997; MERTENS *et al.*, 1993).

Análises de CGH tem encontrado perdas freqüentes em 13q (ZIELENSKA *et al.*, 2001; OZAKI *et al.*, 2002; OVERHOLTZER *et al.*, 2003; LAU *et al.*, 2004). Lau *et al.* (2004) encontraram perdas de 13q em 46% dos casos. Tarkkanen *et al.* (1999) detectaram perdas em 13q21 e 13q14 (locus do gene *RB1*) em 26% e 19% dos casos de OS respectivamente. Ozaki *et al.* (2002) encontraram perdas de 13q14 em 41% dos casos utilizando CGH e FISH; determinando que as perdas em 13q14, tanto isoladas como em combinação com outras alterações cromossômicas (principalmente perda de 8q), representam um forte fator prognóstico desfavorável. Nossos

resultados demonstram um perfil de CGH peculiar para o cromossomo 13; detectamos perdas na região específica 13q13-q14, região que inclui o locus do gene *RB1*, e ganhos de 13q31; a frequência de ambas alterações foi de 56% dos casos analisados (Figura 9).

Figura 9. Alterações no número de cópias do cromossomo 13 nas 9 amostras de OS. As linhas verticais verdes e vermelhas correspondem a ganhos e perdas, respectivamente. As linhas azuis representam regiões mínimas de sobreposição comuns em no mínimo 50% das amostras.

Varias investigações tem encontrado 60-70% dos osteossarcomas com perda de heterozigosidade (LOH) no locus *RB1* (WADAYAMA *et al.*, 1994; FEUGEAS *et al.*, 1996); e, acredita-se que a LOH do gene *RB1* constitui um forte marcador de prognóstico desfavorável (FEUGEAS *et al.*, 1996). Paradoxalmente, Wadayama *et al.*, (1994) mostraram que LOH no locus *RB1* não indica necessariamente mutação de *RB1* e que a não expressão de *RB1* não correlaciona-se com o prognóstico. Deste modo é possível pensar que outros genes em 13q poderiam estar relacionados com um prognóstico desfavorável ou que a LOH poderia representar uma forma de instabilidade

genômica geral relacionada com progressão tumoral (WADAYAMA *et al.*, 1994).

A região 13q14 contém os genes *LEU1* (gene 1 associado a leucemia) e *LEU2* (gene 2 associado a leucemia), os quais são fortes candidatos de genes supressores de tumor importantes em leucemia linfocítica crônica. Outras regiões tem sido investigadas como a região 13q12.3 onde se localiza o gene *BRCA2* (câncer de mama 2); mutações nesse gene conferem um risco elevado para desenvolver câncer de mama e outras neoplasias. O gene *ING1* (inibidor de crescimento 1) é um gene candidato de gene supressor de tumor, clonado e mapeado em 13q34. Esta região é conhecida para conter alterações em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (KNUUTILA *et al.*, 1999).

O ganho de 13q31 detectado em nosso estudo com uma frequência de 56%, não é uma alteração comumente descrita, sendo necessária a realização de investigações futuras para determinar a relevância biológica desta alteração.

5.2. Outras alterações

Outras alterações presentes em nosso estudo, com uma frequência considerável; porém, com poucos relatos na literatura em relação com OS, incluem ganhos nas regiões cromossômicas 6q16 (56%), 7p11.2-12 (67%) e 7q (7q21 e 7q32-35 em 67%), 10p11.2-p12 (67%) 11p12-p14 (67%), 12p (67%),

12q13-q14 (56%), 14q11.2-q21(56%), 14q32 (56%), 16p12 (67%), 16q12-q13 (67%), 21q11.2-q21 (56%), e perdas em 9q22-q31 (56%), 11q13 (56%), 17q21-q22 (56%).

O presente estudo encontrou maior número de cópias no cromossomo 6 em 8 dos 9 casos, especificamente na região 6q16 (56%). Em contraste, Ohata *et al.*, (2006) encontrou perda alélica em 74% das amostras de OS analisadas pela LOH, identificando possíveis candidatos de genes supressores de tumor em 6q16-q23. A diferença entre as duas metodologias pode acontecer devido à dificuldade de se detectar perdas pequenas pela CGH. A CGH avalia cópias de genes num nível cromossômico, enquanto que a LOH identifica alelos. Além disso, LOH não necessariamente é acompanhada por perda física de material cromossômico (STOCK *et al.*, 2000).

Um estudo tem referido ganhos freqüentes na região mínima 7q31-q32 em 7 de 13 casos (54%) de OS analisados (STOCK *et al.*, 2000). Nossa investigação detectou ganhos comuns nas regiões adjacentes 7q21 e 7q32-35 em 67%, e no braço curto 7p11.2-12 na mesma freqüência (67%).

Perdas freqüentes no cromossomo 10 têm sido descritas por vários autores (TARKKANEN *et al.*, 1995, 1999; ZIELENSKA *et al.*, 2001; OZAKI *et al.*, 2002; BARUFFI *et al.*, 2003; OVERHOLTZER *et al.*, 2003; LAU *et al.*, 2004; OHATA *et al.*, 2006). Contrariamente, nossos resultados mostraram ganhos de 10p11.2-p12 em 67% de nossos casos. A relevância desse resultado precisa ser determinada.

Em nosso estudo encontramos ganhos em 12q em 7 dos 9 casos, especificamente na região 12q13-q14 (56%). Tarkkanen *et al.* (1999) detectaram maior número de cópias de 12q em 8 tumores (26%), com a região mínima 12q13-q14. Vários genes candidatos se encontram presentes especificamente na região cromossômica 12q13-q14, incluindo *GLI*, *CHOP*, *SAS*, *HMGIC*, *CDK4* e *MDM2*; ampliações dessa região tem sido relatados em vários sarcomas, incluindo OS (FORUS *et al.*, 1995a). Os genes *CDK4* e *MDM2*, localizados na região 12q13-q15, se encontram diretamente relacionados com a patogênese de OS. Os dois genes codificam proteínas que controlam negativamente as vias do *RB1* e *TP53*. A amplificação ou sobreexpressão desses genes resulta em inativação funcional das vias de sinalização *RB1* e *TP53*, respectivamente. Além disso, a amplificação de *MDM2* tem sido associada com desenvolvimento de tumores recorrentes ou metastáticos (LADANYI *et al.*, 1993; NAKAYAMA *et al.*, 1995).

Aguiar *et al.* (2007) relataram alterações frequentes do cromossomo 21, maioritariamente perdas em 26 de 41 casos (63%) de OS; especificamente na região 21q11.2-21. Contrariamente, nosso estudo observou ganhos em 7 de 9 casos (78%), maioritariamente na mesma região 21q11.2-21. Da mesma forma, Batanian *et al.* (2002) encontraram ganhos em 21q em 2 de 4 casos de OS. Futuras análises precisam ser realizadas para determinar a relação entre essa alteração e a oncogênese do OS.

Outras alterações descritas no presente estudo como ganhos em 11p, 14q e perdas em 9q, 11q e 17q corresponderiam a novas alterações ate

agora não descritas como freqüentes em OS, sendo necessárias posteriores análises.

As perdas em 9q, descritas em nosso estudo e presentes em 89% dos casos, se encontram distribuídas em diversas regiões do braço cromossômico; entretanto, 5 dos 9 casos (56%) correspondem a perda da região 9q22-q31. Estudos realizados em carcinoma de células transicionais de bexiga utilizando análises de LOH tem descrito pelo menos 3 regiões comuns de deleção em 9q: 9q13-q31, 9q32-q33, e 9q34 (KNUUTILA *et al.*, 1999). O gene de reparo *XPA*, o qual encontra-se mutado em xeroderma pigmentosum tipo A, está localizado em 9q22.3-q31. Em uma região próxima (9q22.3) reside o gene *PTCH*, um gene candidato da síndrome do nevo da célula basal, caracterizada por múltiplos carcinomas de células basais e anormalidades do desenvolvimento.

Apesar de que vários estudos descrevem ganhos freqüentes do braço curto do cromossomo 17 (FORUS *et al.*, 1995b; ZIELENSKA *et al.*, 2001; BATANIAN *et al.*, 2002; OVERHOLTZER *et al.*, 2003; LAU *et al.*, 2004), nosso estudo não observou esse mesmo padrão nessa região. As perdas do braço cromossômico 17q foram freqüentes na nossa análise (78%), especificamente na região 17q21-q22 (56%) onde se encontra localizado o gene supressor de tumores *BRCA1*, importante no desenvolvimento de câncer de mama e ovário (KNUUTILA *et al.*, 1999).

5.3. Amostras pareadas

As técnicas de citogenética molecular têm colaborado significativamente com a descrição precisa de alterações citogenéticas, as quais não podiam ser completamente definidas pela análise convencional. Ao mesmo tempo, os estudos de evolução cariotípica e progressão neoplásica tem sido de interesse científico durante décadas e otimizados com a utilização dessas recentes metodologias. As variações genômicas que acompanham aos processos de progressão tumoral e metástase, geram desequilíbrios genômicos que podem ser detectados pelas técnicas de citogenética clássica e molecular.

Estudos utilizando tanto citogenética clássica como análises comparativas de CGH em amostras consecutivas tem sido realizados em varias neoplasias (HUANG *et al.*, 2002; BASTIAN *et al.*, 2003; GEBHART, 2004). Tumores primários e suas metástases correspondentes apresentam freqüentemente padrões similares de alterações no número de cópias de DNA; porém, por exemplo em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, a discordância de alterações entre amostras primarias e suas amostras metastáticas correspondentes pode variar de 0 a 100% (TREMMELE *et al.*, 2003).

Nosso estudo determinou alterações citogenéticas compartilhadas e não compartilhadas em amostras sucessivas de três pacientes diferentes; e,

apesar da heterogeneidade das amostras e a complexidade das alterações descritas, podem se obter algumas associações importantes.

As alterações cromossômicas descritas foram muito variadas nos três casos. Alterações compartilhadas representaram o 39% das alterações encontradas nos três pacientes. O ganho do braço curto do cromossomo 8 (8p) foi a única alteração compartilhada que se apresentou nos 3 pacientes, o que manifestaria a importância desta alteração no processo neoplásico independentemente do estágio tumoral.

5.3.1 Pacientes A e B

Apesar de não acontecerem nas mesmas regiões cromossômicas, ganhos em 2q e 16p e perda em 3q foram as únicas alterações compartilhadas que se apresentaram tanto no paciente A como no paciente B. Cabe ressaltar que as amostras pareadas desses pacientes foram coletadas seguindo o mesmo padrão, ou seja, biopsia e amostra de ressecção após QT. Interessantemente, os dois casos apresentaram o mesmo número de alterações compartilhadas (37 alterações) e frequências similares de alterações compartilhadas (54 e 50% respectivamente). Essas informações poderiam sugerir a identidade tumoral e a relação clonal existente entre as amostras pareadas em cada caso, e que se mantém após tratamento QT.

No entanto, a presença de alterações não compartilhadas indica-nos o “surgimento” de grupos clonais, previamente indetectáveis, e que se revelariam num segundo momento da análise.

5.3.2. Paciente C

Além de majoritárias (61%), as alterações não compartilhadas se apresentaram com maior frequência no paciente C (amostra de ressecção e metastática). É possível que essas alterações divergentes, ocorrendo aparentemente ao acaso em ambas as amostras analisadas, representem a heterogeneidade genética intratumoral, que é revelada após o tratamento QT e que contribuiria significativamente no processo de evolução tumoral.

As amostras pareadas do paciente C apresentaram uma divergência clonal maior (79%) quando comparadas com as amostras dos pacientes A e B. Além disso, as alterações não compartilhadas nesse paciente representaram o 56% de todas as alterações divergentes descritas. Essa alta divergência corresponde-se com a diversificação clonal e heterogeneidade genética tumoral observadas entre um tumor primário e sua(s) metástase(s) correspondente(s).

A heterogeneidade intratumoral é determinante nos processos de progressão neoplásica e disseminação. Comumente, a divergência clonal acontece em estágios iniciais da progressão tumoral e os clones celulares evoluem subsequente de maneira independente, de modo que os

clones progenitores de origem comum não podem ser detectados (KUUKASJARVI *et al.*, 1997). O reconhecimento de alterações citogenéticas relacionadas com o processo inicial de tumorigênese ou das que acontecem em fases mais avançadas, é fundamental para o desenvolvimento de novos fatores preditivos prognósticos do OS.

Interessante que, os cromossomos 1, 9, 10 e 15 viram-se afetados por alterações não compartilhadas nos três pacientes, independentemente da fase neoplásica, sugerindo que esses cromossomos poderiam ter um papel importante na progressão tumoral. Precisam se realizar estudos para definir se essas alterações constituem marcadores importantes de progressão neoplásica, ou simplesmente representam grupos clonais sem relevância neoplásica (Figura 10).

Figura 10. Resumo das alterações não compartilhadas dos cromossomos 1, 9, 10 e 15 nas amostras dos pacientes A, B e C. As linhas verticais verdes e vermelhas correspondem a

ganhos e perdas, respectivamente. Os ideogramas da esquerda e direita indicam às alterações detectadas na primeira e segunda amostra de cada caso, respectivamente.

Em nosso estudo, não pode ser inferido um modelo de progressão tumoral, devido principalmente à grande variedade de alterações ocorrendo aparentemente ao acaso nas amostras analisadas e principalmente, ao número pequeno de casos analisados.

Porém, a amostra metastática do paciente C apresentou ganho em 12q, incluindo 12q13, enquanto a amostra de ressecção não a apresentava previamente (Figura 11). É conhecido que a amplificação do gene *MDM2* (12q13), é uma alteração específica que tem sido relacionada com progressão e metástase em vários tumores incluindo OS (LADANYI *et al.*, 1993; NAKAYAMA *et al.*, 1995).

Figura 11. Resumo das principais alterações no cromossomo 12 das amostras pareadas do paciente C. As linhas verticais verdes e vermelhas correspondem a ganhos e perdas, respectivamente. As linhas internas e externas correspondem às alterações detectadas na amostra de ressecção e metástase, respectivamente.

Esse resultado, junto com a divergência clonal encontrada nesse caso, corroboram a complexidade genética característica de amostras metastáticas. Mais outras duas amostras (Tu 156 e Tu 214) apresentaram ganho na região 12q13; porém, o significado biológico dessa alteração nesses casos não pode ser determinada.

Nossa investigação foi realizada com uma amostragem pequena e ao mesmo tempo heterogênea, sendo detectado um amplo espectro de alterações citogenéticas. A complexidade de alterações descritas nos dificulta a obtenção de um perfil padrão e homogêneo de nossa população, porém, algumas alterações podem ser definidas como mais freqüentes.

Essa alta complexidade cariotípica, observada principalmente em tumores sólidos, tem sido associada a vários estudos de progressão e evolução tumoral. Classicamente, a complexidade cariotípica observada num determinado tumor representa um evento tardio após o acúmulo de mutações gênicas precoces e a geração de instabilidade genômica na célula neoplásica. Esse conceito descreve um modelo linear e contínuo da evolução tumoral [NOWELL, 1976; FEARON, VOGELSTEIN, 1990]. Estudos recentes afirmam que as alterações cromossômicas representam eventos primários na progressão neoplásica, e não são o resultado de desequilíbrios em fases tardias (DUESBERG, 2005; MICHOR *et al.*, 2005).

Muitas investigações tem sido realizados com o objetivo de conhecer os mecanismos chaves da progressão neoplásica, principalmente em

neoplasias hematológicas; as quais, apresentam perfis genéticos com “assinaturas” cariotípicas, ou seja alterações cromossômicas típicas e recorrentes que se correspondem com mecanismos gênicos específicos num subtipo de neoplasia determinada (BULLINGER, VALK, 2005). Como resultado disso, a progressão tumoral pode ser categorizada, de forma relativamente simples, em fases específicas usando cariótipos recorrentes ou através de padrões de expressão gênica.

Esta progressão gradual não é comum em tumores sólidos. Os fatores oncológicos iniciadores de neoplasias sólidas são muito variados e as alterações genéticas predominantes não são do tipo recorrente, dando a impressão que a iniciação e progressão neoplásica em tumores sólidos é mais ou menos aleatória (HEPPNER, MILLER, 1998; MILLER, THERMAN, 2003). Claramente é observado que, na progressão desse grupo de neoplasias estão envolvidas vias genéticas heterogêneas num nível muito mais alto do que em neoplasias hematológicas, sendo necessária uma categorização diferente (HENG *et al.*, 2006).

Em vista das recentes descobertas de que a instabilidade genômica está diretamente relacionada com a geração de alterações cromossômicas, e que a progressão em câncer pode ser caracterizada como uma relação dinâmica entre alterações cromossômicas não clonais e alterações cromossômicas clonais recorrentes (HENG *et al.*, 2004), estudos recentes tem descrito modelos de progressão não linear em tumores sólidos, guiados por esse dinamismo entre alterações cromossômicas clonais e não

clonais (HENG *et al.*, 2006). Por outro lado, esse dinamismo citogenético permitiria realizar um monitoramento da instabilidade genômica (HENG *et al.*, 2006).

Muitas das alterações descritas em nosso estudo, concordam com os resultados publicados por outros autores; porém, têm sido observadas novas alterações freqüentes nesta população. Alguns fatores epidemiológicos podem contribuir nesses resultados, sugerindo novas regiões cromossômicas, antes não descritas, implicadas na patogênese de OS. O acúmulo de dados obtidos pela CGH, ou outras técnicas de citogenética, em um número maior de pacientes ajudará na elucidação final da importância biológica dessas alterações.

A heterogeneidade das alterações detectadas no presente estudo demonstra a alta complexidade de alterações citogenéticas em OS, e a dificuldade de avaliar quais dos ganhos ou perdas cromossômicas são responsáveis especificamente pela tumorigênese ou progressão tumoral em OS. Dessa forma, é evidente a necessidade de intensificar os estudos em tumores primários, recorrentes e metastáticos de OS para a caracterização completa das alterações genéticas próprias de cada estágio tumoral e que determinem progressão neoplásica.

Ao mesmo tempo, um grande número de genes envolvidos na patogênese do OS estão mapeados nas regiões alteradas nos casos analisados no presente estudo. Metodologias de análise de expressão

gênica e protéica deverão definir o real envolvimento dos mesmos na tumorigênese do OS.

Finalmente, a CGH foi útil no rastreamento de ganhos ou perdas no genoma total; porém, é limitada enquanto a sua resolução de detecção. Para validar nossos resultados, é necessário a utilização de outras técnicas de citogenética molecular como FISH e *CGHarray*, as quais fornecem um nível de resolução mais preciso. Todos esses esforços contribuirão no melhor entendimento do comportamento biológico e clínico do OS e outros tumores malignos.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos da análise de 9 amostras pediátricas de OS, utilizando o método Hibridação Genômica Comparativa (CGH), concluímos que:

- Foi detectado um número grande de alterações citogenéticas em comparação com o descrito pela literatura, devido à utilização do Intervalo de Referencia Padrão como critério de detecção.
- Os ganhos mais freqüentes aconteceram nos cromossomos 2 (9 casos), 8 (9casos) e 4q (8casos). As regiões mínimas de sobreposição de ganhos foram 2p13-p14 (78%), 2q36-q37 (78%), 8p22 (78%) e 4q21(78%).
- As perdas mais freqüentes aconteceram nos cromossomos 1p (9 casos) e 3q (8 casos). As regiões mínimas de sobreposição de perdas foram 1p34.2 (67%), 3q22-q23 (67%) e 3q24 (78%).
- Os ganhos de 13q31, 11p, 14q e perdas em 9q, 11q e 17q são freqüentes em nosso estudo e não descritas na literatura.
- A alterações cromossômicas entre as amostras pareadas foram muito variadas, refletindo a heterogeneidade cromossômica intratumoral em cada caso.
- A alta divergência clonal observada na amostra metastática, reflete a complexidade cromossômica adquirida durante a progressão e disseminação no caso descrito.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR SS, ZAMBALDI LJG, DOS SANTOS AM, PINTO JW, BRANDALISE SR.

Comparative genomic hybridization analysis of abnormalities in chromosome 21 in childhood osteosarcoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2007; 175: 35-40.

ARMENGOL, G. and 15 OTHERS. Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridization. *Brit. J. Cancer*. 1997; 75: 1403–1409.

BOEHM AK, SQUIRE JA, BAYANI J, NELSON M, NEFF J, BRIDGE JA. Cytogenetic findings in 36 osteosarcoma specimens and a review of the literature. *Pediatr Pathol Mol Med*. 2000;19:359–76.

AL-ROMAIIH K, BAYANI J, VOROBYOVA J, KARASKOVA J, PARK PC, ZIELENSKA M, SQUIRE JA. Chromosomal instability in osteosarcoma and its association with centrosome abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;144:91-9.

BARUFFI MR, ENGEL EE, SQUIRE JA, TONE LG, ROGATTO SR. Chromosomal imbalances detected in primary bone tumors by comparative genomic hybridization and interphase fluorescence in situ hybridization. *Genetics and Molecular Biology*. 2003; 26:2,107-113.

BASTIAN BC, LEBOT PE, HAMM H, BROCKER EB, PINKEL D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1998; 58: 2170–2175.

BASTIAN BC: Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. *Oncogene.* 2003; 22:3081-3086.

BATANIAN JR, CAVALLI LR, ALDOSARI NM, MA E, SOTELO-AVILA C, RAMOS MB, RONE JD, THORPE CM, HADDAD BR. Evaluation of paediatric osteosarcomas by classic cytogenetic and CGH analyses. *Mol Pathol.* 2002 Dec;55(6):389-93.

BAYANI J, ZIELENSKA M, PANDITA A, AL-ROMAIIH K, KARASKOVA J, HARRISON K, BRIDGE JA, SORENSEN P, THORNER P, SQUIRE JA SKY identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17, and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003; 36:7-17.

BELCHIS DA, GOCKE CD. Alterations in the RB, p16, and cyclin D1 cell cycle control pathway in osteosarcomas. *Pediatr Pathol Mol Med.* 2000;19:377–89.

BENTZ M, PLESCH A, STILGENBAUER S, DÖHNER H, LICHTER P. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998; 21:172–175.

BIELACK SS, KEMPF-BIELACK B, HEISE U, SCHWENZER D, WINKLER K. Combined modality treatment for osteosarcoma occurring as a second malignant disease. Cooperative German-Austrian-Swiss Osteosarcoma Study Group. *J Clin Oncol*. 1999; 17:1164–1174.

BIELACK SS, KEMPF-BIELACK B, DELLING G, EXNER GU, FLEGE S, HELMKE K, KOTZ R, SALZER-KUNTSCHIK M, WERNER M, WINKELMANN W, ZOUBEK A, JURGENS H, WINKLER K. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol*. 2002; 20:776–790.

BRIDGE JA, NELSON M, MCCOMB E, MCGUIRE MH, ROSENTHAL H, VERGARA G, MAALE GE, SPANIER S, NEFF JR. Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;95:74–87.

CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Identification of human chromosome by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma*. 1970a; 60:215-227,

- CASPERSSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Experimental Cell Research*. 1970b; 62:80-492.
- CLARK JCM, DASS CR. A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol*.2008;134:281–297.
- DUESBERG P, LI R, FABARIUS A, HEHLMANN R. The chromosomal basis of cancer. *Cell Oncol*. 2005;27:293–318.
- ENNEKING WF, SPANIER SS, GOODMAN MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res* .1980; 153:106–120.
- FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61:759–767.
- FERRÍS I TORTAJADA J, BERBEL TORNERO O, ORTEGA GARCIA JA, CLAUDIO-MORALES L, GARCIA I CASTELL J, MARTI PERALES V, MIRANDA CASAS L. Factores de riesgo para los tumores óseos malignos pediátricos. *An Pediatr (Barc)*. 2005 Dec; 63(6):537-47.
- FEUGEAS O, GURIEC N, BABIN BOILLETOT A, MARCELLIN L, SIMON P, BABIN S, THYSS A, HOFMAN P, TERRIER P, KALIFA C, BRUNAT-MENTIGNY M, PATRICOT LM, OBERLING F. Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1996; 14:467– 472.

FINKEL MP, BISKIS BO, JINKINS PB. Virus induction of osteosarcomas in mice. Science. 1966;151:698-701.

FLETCHER JA, GEBHARDT MC, KOZAKEWICH HP. Cytogenetic aberrations in osteosarcomas. Nonrandom deletions, rings, and double-minute chromosomes. Cancer Genet Cytogenet. 1994; 77:81-88.

FORUS A, WEGHUIS DO, SMEETS D, FODSTAD O, MYKLEBOST O, VAN KESSEL AG. Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: I. Occurrence of genomic imbalances and identification of a novel major amplicon at 1q21 -q22 in soft tissue sarcomas. Genes Chromosomes Cancer 1995a; 14:8 -14.

FORUS A, WEGHUIS DO, SMEETS D, FODSTAD O, MYKLEBOST O, GEURTS VAN KESSEL A. Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: II. Identification of novel amplicons at 6p and 17p in osteosarcomas. Genes Chromosomes Cancer. 1995b Sep;14(1):15-21.

FORUS A, WETERMAN M, VAN KESSEL AG, BERNER J-M, FODSTAD O, MYKLEBOST O. Characterization of 1q21-22 amplifications in human sarcomas by CGH and molecular analysis. Cytogenet Cell Genet. 1996;72:8 -14.

FUCHS B, PRITCHARD DJ. Etiology of osteosarcoma. Clin Orthopaed Related Res. 2002;397:40-52.

GEBHART E: Comparative genomic hybridization (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. Cytogenet Genome Res. 2004;104:352-358

GLUKHOVA L, GOGUEL AF, CHUDоба I, ANGEVIN E, PAVON C, TERRIER LACOMBE MJ, MEDDEB M, ESCUDIER B, BERNHEIM A. Over-representation of 7q31 and 17q in renal cell carcinomas. Genes Chromosomes Cancer. 1998; 22:171–178.

GORLICK R, ANDERSON P, ANDRULIS I, ARNDT C, BEARDSLEY GP, BERNSTEIN M, BRIDGE J, CHEUNG NK, DOME JS, EBB D, GARDNER T, GEBHARDT M, GRIER H, HANSEN M, HEALEY J, HELMAN L, HOCK J, HOUGHTON J, HOUGHTON P, HUVOS A, KHANNA C, KIERAN M, KLEINERMAN E, LADANYI M, LAU C, MALKIN D, MARINA N, MELTZER P, MEYERS P, SCHOFIELD D, SCHWARTZ C, SMITH MA, TORETSKY J, TSOKOS M, WEXLER L, WIGGINTON J, WITHROW S, SCHOENFELDT M, ANDERSON B. Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. Clin Cancer Res. 2003 Nov 15;9(15):5442-53.

HAYDEN JB, HOANG BH. Osteosarcoma: basic science and clinical implications. *Orthop Clin North Am.* 2006 Jan;37(1):1-7.

HAWKINS MM, WILSON LMK, BURTON HS, POTOK MH, WINTER DL, MARSDEN HB, et al. Radiotherapy, alkylating agents, and risks of bone cancer after childhood cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:270-8.

HENG HH, STEVENS J, LIU G, BREMER SW, YE CJ. Imaging genome abnormalities in cancer research. *Cell Chromosomes.* 2004;3:1.

HENG HHQ, BREMER SW, STEVENS J, YE KJ, MILLER F, LIU G, YE CJ. Cancer Progression by Non-Clonal Chromosome Aberrations *Journal of Cellular Biochemistry.* 2006;98:1424–1435 .

HEPPNER GH, MILLER FR. The cellular basis of tumor progression. *Int Rev Cytol.* 1998; 177:1–56.

HESKETH R. The oncogene and tumour suppressor gene-Facts Book. 2nd ed. London: Academic Press.1997; 216-532.

HOOGERWERF WA, HAWKINS AL, PERLMAN EJ, GRIFFIN CA. Chromosome analysis of nine osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 1994; 9:88-92.

HUANG Q, YU GP, MCCORMICK SA, MO J, DATTA B, MAHIMKAR M, LAZARUS P, SCHÄFFER AA, DESPER R, SCHANTZ SP: Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: Construction of oncogenetic trees for tumor progression. *Genes Chrom Cancer*. 2002; 34:224-233.

HUNG J. ANDERSON R. p53: functions, mutations and sarcomas. *Acta Orthop Scand Suppl* 1997;273:68–73.

HUVOS AG. Bone Tumors. Diagnosis, Treatment, and Prognosis. W.B. Saunders Co., Philadelphia.1991.

KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN F, PINKEL D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992 Oct 30;258(5083):818-21.

KALLIONIEMI OP, KALLIONIEMI A, PIPER J, ISOLA J, WALDMAN FM, GRAY JW, PINKEL D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 Aug;10(4):231-43.

KALLIONIEMI A, VISAKORPI T, KARHU R, PINKEL D, KALLIONIEMI OP. Gene Copy Number Analysis by Fluorescence in Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization. *Methods*. 1996 Feb;9(1):113-21.

KIRCHHOFF M, GERDES T, ROSE H, MAAHR J, OTTESEN AM, LUNDSTEEN C. Detection of chromosomal gains and losses in comparative genomic hybridization analysis based on standard reference intervals. *Cytometry*.1998; 31:163–173.

KIRCHHOFF M, GERDES T, MAAHR J, ROSE H, BENTZ M, DÖHNER H, LUNDSTEEN C. Deletions Below 10 Megabasepairs Are Detected in Comparative Genomic Hybridization by Standard Reference Intervals. *Genes, Chromosomes & Cancer*.1999;25:410–413.

KNUUTILA S, BJORKQVIST AM, AUTIO K, TARKKANEN M, WOLF M, MONNI
KNUUTILA S, BJORKQVIST AM, AUTIO K, TARKKANEN M, WOLF M, MONNI
HEMMER S, ET AL. DNA copy number amplifications in human neoplasmas: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol*. 1998;152:1107–23.

KNUUTILA S, AALTO Y, AUTIO K, BJÖRKQVIST AM, EL-RIFAI W, HEMMER S, HUHTA T, KETTUNEN E, KIURU-KUHLEFELT S, LARRAMENDY ML, LUSHNIKOVA T, MONNI O, PERE H, TAPPER J, TARKKANEN M, VARIS A, WASENIUS W, WOLF M, ZHU Y.

DNA Copy Number Losses in Human Neoplasms. Am J Pathol. 1999, 155:683–694.

KRUZELOCK RP, MURPHY EC, STRONG LC, NAYLOR SL, HANSEN MF. Localization of a novel tumor suppressor locus on human chromosome 3q important in osteosarcoma tumorigenesis. Cancer Res. 1997;57:106 –109.

KUUKASJARVI, T.; KARHU, R. et al. Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. Cancer Research. 1997;57:1597-604.

LADANYI M, CHA C, LEWIS R, JHANWAR SC, HUVOS AG, HEALEY JH. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. Cancer Res. 1993;53:16–8.

NAKAYAMA T, TOGUCHIDA J, WADAYAMA B, KANOE H, KOTOURA Y, SASAKI MS. MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with tumor progression in differentiated adipose-tissue tumors. Int J Cancer. 1995;64:342–6.

LARRAMENDY ML, TARKKANEN M, BLOMQVIST C, VIROLAINEN M, WIKLUND T, ASKO-SELJAVAARA S, ELOMAA I, KNUUTILA S. Comparative genomic hybridization of malignant fibrous histiocytoma reveals a novel prognostic marker. Amer. J. Pathol. 1997a; 151: 1153–1161.

LARRAMENDY, M.L., TARKKANEN, M., VALLE, J., KIVIOJA, A.H., ERVASTI,H., KARAHARJU, E., SALMIVALLI, T., ELOMAA, I., KNUUTILA, S., Gains, losses, and amplifications of DNA sequences evaluated by comparative genomic hybridization in chondrosarcomas. *Amer. J. Pathol.*1997b; 150:685–691.

LAU CC, HARRIS CP, LU X, PERLAKY L, GOGINENI S, CHINTAGUMPALA M, HICKS J, JOHNSON ME, DAVINO NA, HUVOS AG, MEYERS PA, HEALY JH, GORLICK R, RAO PH. Frequent Amplication and Rearrangement of Chromosomal Bands 6p12-p21 and 17p11.2 in Osteosarcoma. *Genes, Chromosomes & Cancer.*2004; 39:11 –21.

LAULEDERKIND SJ, KIRTIKARA K, RAGHOW R, BALLOU LR. The regulation of PGE(2) biosynthesis in MG-63 osteosarcoma cells by IL-1 and FGF is cell density-dependent. *Exp Cell Res.* 2000;258:409 –16.

LEVAN A., Non-random representation of chromosome types in human tumor stemlines, *Hereditas.*1966; 55: 28–38.

LE VU B, DE VATHAIRE F, SHAMSALDIN A, HAWKINS MM, GRIMAND E, HARDIMAN C, et al. Radiation dose, chemotherapy and risk of osteosarcoma after solid tumors during childhood. *Int J Cancer.* 1998;77:370-7.

LINK MP, EILBER F. Osteosarcoma. In: PIZZO PA e POPLACK DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott Co., 1993. 35, p 841.

LONGHI A, ERRANI C, DE PAOLIS M, MERCURI M, BACCI G. Primary bone osteosarcoma in the pediatric age: State of the art. Cancer Treatment Reviews. 2006; 32: 423-436.

MARINA N, GEBHARDT M, TEOT L, GORLICK R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. Oncologist. 2004;9(4):422-41.

MERTENS F, MANDAHN N, ORNDAL C, BALDETORP B, BAUER HC, RYDHOLM A, WIEBE T, WILLEN H, AKERMAN M, HEIM S. Cytogenetic findings in 33 osteosarcomas. Int J Cancer. 1993;55:44 –50.

MERTENS F, LARRAMENDY M, GUSTAVSSON A, GISSELSSON D, RYDHOLM A, BROSJÖ O, MITELMAN F, KNUUTILA S, MANDAHN N. Radiation-associated sarcomas are characterized by complex karyotypes with frequent rearrangements of chromosome arm 3p. Cancer Genet Cytogenet 2000;116:89-96.

MICHOR F, IWASA Y, VOGELSTEIN B, LENGAUER C, NOWAK MA. Can chromosomal instability initiate tumorigenesis? Semin Cancer Biol 15:43–49.

Bullinger L, Valk PJ. 2005. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. J Clin Oncol . 2005;23:6296–6305.

MILLER CW, ASLO A, TSAY C, SLAMON D, ISHIZAKI K, TOGUUCHIDA J, YAMAMURO T, LAMPKIN B, KOEFFLER HP. Frequency and structure of p53 rearrangements in human osteosarcoma. Cancer Res 1990;50:7950–4.

MILLER OJ, THERMAN E. Human Chromosome. New York Inc: Springer-Verlag. 2003.

MITELMAN F, JOHANSSON B, MANDAHL N, MERTENS F. Clinical Significance of Cytogenetic Findings in Solid Tumors. Cancer Genet Cytogenet.1997a; 95:1-8.

MITELMAN F, MERTENS F, JOHANSSON B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. Nat Genet. 1997b; 15:417–74.

MITELMAN, F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. Mutation Research.2000; 462: 247-253.

NAGARAJAN R, WEIGEL BJ, THOMPSON RC, PERENTESIS JP. Osteosarcoma in the first decade of life.Med Pediatr Oncol. 2003 Nov;41(5):480-3.

MURATA H, KUSUZAKI K, TAKESHITA H, HIRASAWA Y, ASHIHARA T, ABE T, INAZAWA J.

Aberrations of chromosomes 1 and 17 in six human osteosarcoma cell lines using double-target fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 1998; 107:7 –10.

MURATA H, KUSUZAKI K, HIRASAWA Y, ASHIHARA T, ABE T, INAZAWA J.

Relationship between chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization and DNA ploidy by cytofluorometry in osteosarcoma. *Cancer Letters.* 1999; 139:221-226.

NESBIT CE, TERSAK JM AND PROCHOWNIK EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene.* 1999; 18:3004- 3016.

NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 1960;132:1497.

NOWELL PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976; 194:23-28.

OHATA N, ITO S, YOSHIDA A, KUNISADA T, NUMOTO K, JITSUMORI Y, KANZAKI H, OZAKI T, SHIMIZU K, OUCHIDA M. Highly frequent allelic loss of chromosome 6q16-23 in osteosarcoma: Involvement of cyclin C in osteosarcoma. *International Journal of Molecular Medicine.* 2006; 18: 1153-1158.

OVERHOLTZER M, RAO PH, FAVIS R, LU X , ELOWITZ MB, BARANY F, LADANYI M, GORLICK R , LEVINE AJ. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. PNAS.2003; 100(20):11547–11552.

OZAKI T, SCHAEFER KL, WAI D, BUERGER H, FLEGE S, LINDNER N, KEVRIC M, DIALLO R, BANKFALVI A, BRINKSCHMIDT C, JUERGENS H, WINKELMANN W, DOCKHORN-DWORNICZAK B, BIELACK SS, POREMBA C. Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in osteosarcomas. Int J Cancer. 2002;102:355-65.

OZAKI T, NEUMANN T, WAI D, SCHAEFER KL, VAN VALEN F, LINDNER N, SCHEEL C, BOCKER W, WINKELMANN W, DOCKHORN-DWORNICZAK B, HORST J, POREMBA C. Chromosomal alterations in osteosarcoma cell lines revealed by comparative genomic hybridization and multicolor karyotyping. Cancer Genet Cytogenet. 2003; 140:145 –152.

PETRILLI AS, DE CAMARGO B, FILHO VO, BRUNIERA P, BRUNETTO AL, JESUS-GARCIA R, CAMARGO OP, PENA W, PÉRICLES P, DAVI A, PROSPERO JD, ALVES MT, OLIVEIRA CR, MACEDO CR, MENDES WL, ALMEIDA MT, BORSATO ML, DOS SANTOS TM, ORTEGA J, CONSENTINO E; BRAZILIAN OSTEOSARCOMA TREATMENT GROUP STUDIES III AND IV. Results of the

Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: Prognostic Factors and Impact on Survival. J Clin Oncol. 2006 Mar 1;24(7):1161-8.

PICCI P. Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma). Orphanet Journal of Rare Diseases. 2007; 2:6.

ROGATTO SR; RAINHO CA. Citogenética Molecular. In: ROGATTO SR. Citogenética sem risco: Biossegurança e garantia de qualidade. 1ra ed. Ribeirão Preto: Funpec-RP, 2000, Cap7. p 133-152.

SANDBERG AA, BRIDGE JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. Cancer Genet Cytogenet. 2003;1-30.

SCHWAB M. Amplification of the N-myc oncogene and loss of cancer preventing genetic information on chromosome 1p in human neuroblastoma. In: Hengstler JG, Oesch F, eds. Control Mechanisms in Carcinogenesis. 1996;266– 279.

SCHRÖCK E, THIEL G, LOZANOVA T, DU MANOIR S, MEFFERT MC, JAUCH A, SPEICHER MR, NURNBERG P, VOGEL S, JÄNISCH W, DONIS-KELLER H, RIED T, WITKOWSKI R, CREMER T. Comparative genomic hybridization of human

malignant gliomas reveals multiple amplification sites and nonrandom chromosomal gains and losses. *Am J Pathol.*1994;144:1203–1208.

SIMONET WS, LACEY DL, DUNSTAN CR, KELLEY M, CHANG MS, LUTHY R, NGUYEN HQ, WOODEN S, BENNETT L, BOONE T, SHIMAMOTO G, DEROSE M, ELLIOTT R, COLOMBERO A, TAN HL, TRAIL G, SULLIVAN J, DAVY E, BUCAY N, RENSHAW GEGG L, HUGHES TM, HILL D, PATTISON W, CAMPBELL P, SANDER S, VAN G, TARPLEY J, DERBY P, LEE R, AMGEN EST PROGRAM, BOYLE WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.*1997; 89:309 –319.

SKUBITZ KM, D 'ADAMO DR. Sarcoma. *Mayo Clin Proc.* Mayo Clin Proc. 2007;82(11):1409-1432

SLATER O, SHIPLEY J. Clinical relevance of molecular genetics to paediatric sarcomas *J. Clin. Pathol.* 2007;60:1187-1194.

STOCK C, KAGER L, FINK FM, GADNER H, AMBROS PF. Chromosomal regions involved in the pathogenesis of osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Jul;28(3):329-36.

TABAS JA, ZASLOFF M, WASMUTH JJ, EMANUEL BS, ALTHERR MR, MCPHERSON JD, WOZNEY JM, KAPLAN FS. Bone morphogenetic protein: chromosomal

localization of human genes for BMP1, BMP2A, and BMP3. *Genomics*. 1991; 9:283–289.

TARKKANEN M, KARHU R, KALLIONIEMI A, ELOMAA I, KIVIOJA AH, NEVALAINEN J, BOHLING T, KARAHARJU E, HYYTINEN E, KNUUTILA S, et al. Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*. 1995 Mar 15;55(6):1334-8.

TARKKANEN M, ELOMAA I, BLOMQVIST C, KIVIOJA AH, KELLOKUMPU-LEHTINEN P, BOHLING T, VALLE J, KNUUTILA S. DNA sequence copy number increase at 8q: a potential new prognostic marker in high-grade osteosarcoma. *Int J Cancer*. 1999 Apr 20;84(2):114-21.

THORNER PS; SQUIRE JA. Molecular Genetics in the Diagnosis and Prognosis of Solid Pediatric Tumors *Pediatric and Developmental Pathology*. 1998; 1: 337–365.

TIRKKONEN M, TANNER M, KARHU R, KALLIONIEMI A, ISOLA J, KALLIONIEMI OP. Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer*. 1998; 21:177–184.

TREMMELE SC, GÖTTE K, POPP S, WEBER S, HÖRMANN K, BARTRAM CR, JAUCH A. Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer

detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003; 144:165-174.

VAN ROY N, JAUCH A, VAN GELE M, LAUREYS G, VERSTEEG R, DE PAEPE A, CREMER T, SPELEMAN F. Comparative genomic hybridization analysis of human neuroblastomas: detection of distal 1p deletions and further molecular genetic characterization of neuroblastoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet.* 1997; 97:135–142.

VAN STEENIS H, Chromosomes and cancer, *Nature.* 1966; 209: 819–821.

WITTIG JC, BICKELS J, PRIEBAT D, JELINEK J, KELLAR-GRANEY K, SHMOOKLER B, MALAWER MM. Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *Am Fam Physician.* 2002 Mar 15;65(6):1123-32.

VAYEGO SA, DE CONTI OJ, SILVA AE. Aspectos genético-moleculares dos tumores ósseos *Rev Bras Ortop.* 1998 Novembro; 33:11.

WADAYAMA B, TOGUCHIDA J, SHIMIZU T, ISHIZAKI K, SASAKI MS, KOTOURA Y, YAMAMURO T. Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res.* 1994; 54:3042–3048.

WEBER RG, RIEGER J, NAUMANN U, LICHTER P, WELLER M. Chromosomal imbalances associated with response to chemotherapy and cytotoxic

cytokines in human malignant glioma cell lines. *Int J Cancer*. 2001; 91:213–18.

WEISS M M, HERMSEN M A J A, MEIJER G A, VANGRIEKEN N C T, BAAK J P A, KUIPERS E J, VAN DIEST P J. Comparative genomic hybridisation. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 1999;52:243–251.

ZIELENSKA M, BAYANI J, PANDITA A, TOLEDO S, MARRANO P, ANDRADE J, PETRILLI A, THORNER P, SORENSEN P, SQUIRE JA. Comparative genomic hybridization analysis identifies gains of 1p35 approximately p36 and chromosome 19 in osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001 Oct 1;130(1):14-21.

8. ANEXOS

ANEXO I.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO TRABALHO: Perfil Genômico em Osteossarcomas da Infância através da Hibridização Genômica Comparativa.

Orientador: Prof. Dr. Luís Gonzaga Tone.

Orientando: Angel Mauricio Castro Gamero.

O osteossarcoma é o tipo de tumor ósseo maligno mais comum em crianças, apresenta uma alta agressividade, assim como uma grande complexidade genética, ainda em estudo. O objetivo deste trabalho é investigar alterações cromossômicas em osteossarcoma que constituam marcadores genéticos os quais possam se usar como marcadores prognósticos.

O seu filho(a) não será submetido a nenhum procedimento (coleta de sangue, cirurgias, biópsias, raio-X, etc) para a elaboração deste projeto, pois o material de estudo será obtido durante os exames e procedimentos de rotina para o diagnóstico e tratamento das crianças, não trazendo nenhum risco ou sofrimento adicional.

Durante a realização desta pesquisa não haverá nenhum custo para os familiares das crianças que estejam participando da mesma.

À criança e aos seus responsáveis serão garantidos ainda o que segue:

1. O esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outras situações relacionadas com a pesquisa.
2. A liberdade de retirar o consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade do tratamento da criança.

3. A segurança de que a criança não será identificada e que será mantido o caráter confidencial de todas as informações obtidas com a criança, com os seus familiares ou no prontuário médico.
4. O compromisso de que quando solicitado, serão prestadas aos responsáveis pela criança, informações atualizadas durante o estudo.
5. O compromisso de que a criança será devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de participação do projeto, bem como a de que será garantida a continuidade de seu tratamento após a conclusão dos trabalhos de pesquisa.
6. O ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da participação da criança na pesquisa, assim como a indenização, a título de cobertura material, da reparação de danos imediatos ou tardios decorrentes da participação da criança na pesquisa que será realizada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimentos de eventuais dúvidas sobre a pesquisa e sobre a ética em pesquisa. O principal investigador é Angel Mauricio Castro Gamero que pode ser encontrado no endereço Laboratório de Oncopediatria, sala 212, primeiro andar do Bloco G, Hospital Das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP), situado na Av. Bandeirantes, 3900. Campus Universitário. Monte Alegre – CEP 14.048-900 – Ribeirão Preto –SP. Telefone: (16) 3602-2671 ou pelo e-mail amcgen@usp.br. Você poderá entrar em contato, caso sinta necessidade, com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP no mesmo hospital pelo telefone (16) 3602-2228 ou pelo e-mail cep@hcrp.fmrp.usp.br.

Eu _____tenho sido devidamente esclarecido(a) sobre todas as questões que constam no documento, especialmente no que diz respeito aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos que serão realizados, aos riscos e benefícios, a forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que foram assegurados e que concordo inteiramente e de livre vontade que meu filho(a) _____ participe desta pesquisa.

Ribeirão Preto ____de____de_____.

Assinatura do Responsável pelo Paciente

Assinatura do Pesquisador Responsável

Anexo II.

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Ribeirão Preto, 20 de dezembro de 2006

Ofício nº 3710/2006
CEP/SPC

31

A

Prezado Senhor,

O trabalho intitulado **"PERFIL GENÔMICO EM OSTEOSSARCOMAS DA INFÂNCIA ATRAVÉS DA HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 239ª Reunião Ordinária realizada em 18/12/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 12878/2006.

Atenciosamente.

PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
ANGEL MAURÍCIO CASTRO GAMERO
PROF. DR. LUIZ GONZAGA TONE (Orientador)
Depto. de Puericultura e Pediatria

Anexo III.

Tabela 7. Resumo de Investigações de CGH realizados em OS (Modificado desde Ozaki et al., 2002)

Diagnóstico	n	No. de casos com aberrações	Aberrações por tumor	Amplificações	Razão Ganho:Perda	Ganhos frequentes	Perdas frequentes	Amplificações frequentes	Fatores prognósticos
Osteossarcoma (1) (primário 9, metástases 1)	11	10(91%)	11.0	8(73%)	1 : 1.3	8q,Xp, 1q, 11q, Xq	2q, 6q, 8p, 10p	12q12-13; 7p11-12; 3q26; Xq12	---
Osteossarcoma (2) (primário 10, metástases 4)	14	9(64%)	3.1	7(50%)	---	1p, 6p, 8q, 17p	---	8q23-24; 12q12-13	---
Osteossarcoma (3) (alto grau)	31	30(97%)	9.6	21(68%)	1.9 : 1	1q, 8q, 14q, Xp	6q, 10p, 10q	17p11.2-12; Xp11.2-21	ganhos de 8q ou 1q
Osteossarcoma (4) (primário 15, recaída 1)	16	12(75%)	6.1	---	9.9 : 1	8q, 4q, 7q, 1p, 5p	19q, 7p	8q23-24	---
Osteossarcoma (5) (primário 17, metástases 1)	18	18(100%)	4.7	4(22%)	2.7 : 1	1p, 19, 17p, 5p, 16p, 8q	2q, 10, 13	8q22-qter; 8q; 17p	---
Osteossarcoma (6) (primário)	41	40(98%)	16.1	32(78%)	1.3 : 1	8q, 1p, 1q, 4q, 6p	10q, 5q, 13q, 2q	8q23-24; 17p13; 1q21-24; 1p21-31;19p	perdas de 5q ou 13q
Osteossarcoma (7) (primário)	3	3(100%)	11.5	2(66%)	2 : 1.	4q, 1p, 17p, 21q	3q, 16p	1q11-23; 6p21; 8q13; 8q21.3-24.2; 17p	---
Osteossarcoma (8) (primário)	3	3(100%)	5.3	1(33%)	1 : 1.	8q22.3-24.1	10p14-pter	11q12-qter	---
Osteossarcoma (9) (primário)	34	34(100%)	7.7	NI	---	6p12, 17p, 1p, 8q, 20q, Xp, 5p, 1q21, 17q	18q21-23, 6q16, 10q, 13q, 10p	17p11.2, 6p12, 8q24, 1q21	---
Osteossarcoma (10) (primário 17, metástases 8)	25	25(100%)	15.3	NI	0.79:1	1p, 8q, Xp, 17p, Xq, 5q, 6p, 20q	3p, 13q, 2q, 9, 14q, 10p, 16, 18q, 3q, 12q, 15q, 17p,	17p11.2, 6p12-21, 12q13-14	---
Osteossarcoma (11) (primário)	41	NI	NI	NI	NI	1, 2p, 5, 6p, 3q	21, 16, 14q, 15q	1p, 5p,	---
Osteossarcoma (12) primário	12	12 (100%)	NI	6 (50%)	NI	1p, 4p, 4q, 5q, 8q	10p, 10q, 6q, 8p, 10p, 18q	4q, 1p, 1q, 8q21, 2q, 14q32	

NI: Não informado. (1) Tarkkanen , 1995. (2) Forus, 1995. (3) Tarkkanen, 1999. (4) Stock, 2000. (5) Zielenska, 2001. (6) Ozaki, 2002. (7), Batanian, 2002. (8) Baruffi, 2003. (9) Overholtzer, 2003. (10) Lau, 2004, (11) Aguiar (2007), (12) Ohata, 2006