

MARIA FERNANDA CARRIEL AMARY

**Detecção da fusão *SS18-SSX* em material parafinado e
comparação de métodos moleculares como ferramentas
no diagnóstico do Sarcoma Sinovial**

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

Área de Concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Del Carlo Bernardi

São Paulo

2007

A Maria Regina,minha mãe,
pelo amor e apoio incondicionais.

A Jorge, meu pai e professor,
razão da minha escolha profissional,
minha grande inspiração e exemplo.

A Jorge, Ricardo e Marília, meus irmãos,
pela presença marcante e apoio em todos os momentos.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabíola Del Carlo Bernardi, professora e amiga. Agradeço o seu apoio, cuidado, orientação em todos os aspectos, incentivo, exemplo profissional, ético e humano.

À Profa. Dra. Adrienne M. Flanagan, orientadora do estágio no exterior, agradeço pela orientação, exemplo, ensinamentos e pela possibilidade da realização dos métodos moleculares.

À Profa. Dra. Carmen Lucia Penteado Lancellotti, professora e amiga, incentivadora em todos os momentos.

À Dra Marília Germanos de Castro, companheira em todos os momentos, pelo apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. José Donato de Próspero, grande didata, exemplo profissional, agradeço a formação constante em patologia.

Ao Prof. Dr. Dino Martini Filho, chefe do Serviço de Anatomia Patológica, pelo apoio e incentivo constantes.

Ao Prof. Dr. Roberto Antonio Pinto Paes, pelo apoio e influência na obtenção do estágio na Inglaterra.

Às Doutoradas Helena Muller e Maria Antonieta Longo Galvão, companheiras de todos os plantões, pela compreensão e apoio.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Patologia, companheiros na convivência diária, agradeço o apoio em todos os momentos.

Aos colegas e funcionários do *University College London* e *Royal National Orthopaedic Hospital*, pelo apoio e ensinamentos na área molecular.

Ao Prof. Dr. Pedro Péricles Ribeiro Baptista e ao Dr Eduardo Sadao pelo apoio e ensinamentos na área de Oncologia Ortopédica.

À Sra. Ana Paula Scramin pela colaboração nas análises estatísticas.

À minha tia, Profa Violette Nagib Amary, pela revisão do texto.

Aos residentes da Anatomia Patológica e aos alunos da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), cuja existência fundamenta todo este trabalho.

A todos os meus professores da FCMSCSP que, com seu exemplo de dedicação e amor à profissão, me estimularam a seguir tal carreira.

À pós-graduação da Universidade de São Paulo pela oportunidade e confiança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à FCMSCSP pelo auxílio financeiro.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Resumo

Summary

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução / Revisão da Literatura | 1 |
| 1.1 Relevância clínica | 1 |
| 1.2 Tratamento | 4 |
| 1.3. Caracterização Morfológica - Fatores Prognósticos | 5 |
| 1.4. Caracterização Citogenética e Molecular | 14 |
| | |
| 2. Objetivos | 22 |
| | |
| 3. Métodos | 23 |
| 3.1 Casuística | 23 |
| 3.2 Métodos..... | 23 |
| 3.2.1 Caracterização Morfológica..... | 24 |
| 3.2.2. Imuno-histoquímica | 26 |
| 3.2.3. <i>Array</i> de tecido | 27 |
| 3.2.4. Extração do RNA | 29 |
| 3.2.5. Transcrição reversa | 31 |
| 3.2.6. Reação de cadeia em polimerase quantitativa (qPCR) | 32 |
| 3.2.7. Reação de Cadeia em Polimerase Convencional | 34 |
| 3.2.8. Controles para RT-PCR | 35 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.9. Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH) | 35 |
| 3.2.10. Análise estatística | 37 |
| 4. Resultados | 38 |
| 4.1 Características clínicas e histológicas | 38 |
| 4.1.1. Subtipo histológico | 40 |
| 4.1.2. Índice mitótico | 41 |
| 4.1.3. Resultados imuno-histoquímicos | 42 |
| 4.2. Resultados quanto à detecção da fusão <i>SS18-SSX</i> | 45 |
| 4.3. Resultados quanto ao tipo de fusão <i>SS18-SSX</i> | 46 |
| 4.4. Análise estatística quanto ao tipo de fusão <i>SS18-SSX</i> | 47 |
| 4.5. Resultados dos casos utilizados como controle negativo | 50 |
| 4.6. Resultados quanto à detecção de rearranjo de <i>SS18</i> por FISH | 52 |
| 5. Discussão | 55 |
| 6. Conclusões | 67 |
| 7. Anexos | 68 |
| 8. Referências | 79 |
| 9. Apêndices (Publicações)..... | 91 |

Lista de Abreviaturas, siglas e símbolos

| | |
|--------|---|
| µl | microlitro |
| BI | Bifásico |
| cDNA | Ácido Desoxirribonucléico, fita complementar |
| CGA | Campo de grande aumento |
| CK | citoqueratina |
| cm | centímetro |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| EMA | antígeno epitelial de membrana |
| FNCLCC | <i>Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer</i> |
| FISH | Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência |
| G6PD | Glicose-6-fosfato desidrogenase |
| HE | hematoxilina & eosina |
| IH | imuno-histoquímica |
| ISH | Hibridização <i>in situ</i> |
| mg | milígrama |
| ml | mililitro |
| MP | Monofásico Fibroso |
| n | número de casos |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| p | braço curto do cromossomo |
| PD | Pouco Diferenciado |
| PNET | Tumor Neuroectodérmico Primitivo |

q braço longo do cromossomo

RNA Ácido Ribonucléico

RT-PCR Reação em Cadeia de Polimerase, transcriptase reversa

qRT-PCR quantitativo (técnica de *Real time*)

SS Sarcoma Sinovial

t translocação

TMBNP Tumor maligno da bainha do nervo periférico

x^2 qui quadrado

Resumo

Amary, MFC. *Detecção da fusão SS18-SSX em material parafinado e comparação de métodos moleculares como ferramentas no diagnóstico do Sarcoma Sinovial* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 100p.

O Sarcoma Sinovial revela consistentemente t(X;18) resultando em SS18-SSX1, SS18-SSX2 e raramente SS18-SSX4. Dos 328 casos incluídos neste estudo, Sarcoma Sinovial foi considerado a primeira possibilidade diagnóstica ou um importante diagnóstico diferencial em 134 casos: destes, cDNA de qualidade foi obtido em 131. A fusão SS18-SSX foi identificada em 126 (96%) casos (74 SS18-SSX1, 52 SS18-SSX2) através de qRT-PCR e 120 (92%) por RT-PCR convencional. 101 casos no *array* de tecidos, analisados por FISH, revelaram que 87 (86%) mostraram rearranjo do SS18. Quatro casos positivos por RT-PCR mostraram perda de um sinal *spectrum green* e 15 casos revelaram cópias múltiplas de SS18: ambos os achados são potencialmente problemáticos na interpretação de resultados. Um dos 3 casos não analisados por RT-PCR por não ter gerado cDNA de qualidade, foi positivo por FISH. A fusão SS18-SSX1 foi demonstrada em 56 SS monofásicos e 18 SS bifásicos. SS18-SSX2 foi detectada em 41 monofásicos e 11 bifásicos. Áreas pouco diferenciadas foram identificadas em 44 casos (31%). Não houve correlação estatisticamente significativa entre os subtipos bifásico, monofásico e o tipo de fusão. Cinco casos foram negativos através dos três métodos utilizados, três de localização pleural. Após correlação clínica, o diagnóstico de mesotelioma foi favorecido em um caso, tumor fibroso solitário em outro e o diagnóstico de sarcoma sem outras especificações no terceiro. A possibilidade do diagnóstico de TMBNP não pode ser excluída nos outros dois casos. Nós concluímos que os métodos moleculares são ferramentas auxiliares importantes para o diagnóstico de SS com 95% de sensibilidade e 100% de especificidade, mas os resultados devem ser interpretados à luz de características clínicas e dados imuno-histoquímicos.

Summary

Amary, MFC. *Detection of SS18-SSX fusion transcripts in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissue and comparison of molecular methods as diagnostic tools for Synovial Sarcoma* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2007. 100p

Synovial Sarcoma consistently harbors t(X;18) resulting in *SS18-SSX1*, *SS18-SSX2* and rarely *SS18-SSX4* fusion transcripts. Of 328 cases included in our study, synovial sarcoma was either the primary diagnosis or was very high in the differential diagnosis in 134 cases: of these, amplifiable cDNA was obtained from 131. *SS18-SSX* fusion products were found in 126 (96%) cases, (74 *SS18-SSX1*, 52 *SS18-SSX2*), using quantitative and 120 by conventional RT-PCR. 101 cases in a tissue microarray, analyzed by FISH, revealed that 87 (86%) showed *SS18* rearrangement: 4 reverse transcriptase –polymerase chain reaction positive cases, reported as negative for FISH, showed loss of one spectrum green signal, and 15 cases had multiple copies of the *SS18* gene: both findings are potentially problematic when interpreting results. One of 3 cases, not analyzed by RT –PCR due to poor quality RNA, was positive by FISH. *SS18-SSX1* was present in 56 monophasic and 18 biphasic synovial sarcoma: *SS18-SSX2* was detected in 41 monophasic and 11 biphasic synovial sarcoma. Poorly differentiated areas were identified in 44 cases (31%). There was no statistically significant association between biphasic, monophasic and fusion type. Five cases were negative for *SS18* rearrangement by all methods, 3 of which were pleural-sited neoplasms. Following clinical input, a diagnosis of mesothelioma was favored in one case, a sarcoma, not-otherwise specified in another and a solitary fibrous tumor in the third case. The possibility of a malignant peripheral nerve sheath tumor could not be excluded in the other 2 cases. We concluded that the employment of a combination of molecular approaches is a powerful aid to diagnosing synovial sarcoma giving at least 96% sensitivity and 100% specificity but results must be interpreted in the light of other modalities such as clinical findings and immunohistochemical data.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

