

Estudo das Alterações Cito-moleculares no Gene *FOXO-1* em Pacientes Pediátricos com Rbdomiossarcoma através da Hibridização *in situ* por Fluorescência

Nicolas Cabral Cunha¹, Fernanda Ferreira da Silva Lima², Arissa Ikeda Suzuki², Priscila Valverde Fernandes³, Paulo Faria³, Sima Esther Ferman², Teresa de Souza Fernandez¹

1- Centro de Transplante de Medula Óssea-CEMO, Laboratório de Citogenética, INCA. 2- Serviço de Oncologia Pediátrica, INCA.

3- Departamento de Anatomia Patológica-DIPAT, INCA.

INTRODUÇÃO

O rbdomiossarcoma (RMS) é o tumor de tecidos moles mais comum na infância. Origina-se no músculo esquelético e apresenta uma incidência de 10-15% dos tumores sólidos pediátricos e 6% de todas as malignidades em crianças. O RMS apresenta dois subtipos principais, o RMS alveolar (RMSa) e o embrionário (RMSe), que apresentam manifestações clínicas e biológicas distintas. O RMSa está associado com um pior prognóstico. Citogeneticamente, o RMSa apresenta, em cerca de 70-80% dos casos, translocações cromossômicas envolvendo o gene *FOXO-1*, sendo a t(2;13)(q35;q14) em 60% dos pacientes e a t(1;13)(p36;q14) em 20% dos casos. Essas translocações resultam na formação e aumento de expressão dos genes quiméricos *PAX3-FOXO1* e *PAX7-FOXO1*, respectivamente. A metodologia da hibridização "in situ" por fluorescência (FISH) tem sido muito utilizada para a pesquisa em rbdomiossarcoma, caracterizando o subtipo RMSa. Nessa metodologia é investigado a presença do rearranjo envolvendo o gene *FOXO1*, como um biomarcador da doença.

OBJETIVO

O objetivo principal deste estudo foi padronizar e analisar a presença do rearranjo no gene *FOXO1* através da hibridização "in situ" por fluorescência (FISH) em pacientes pediátricos com RMS, relatando a frequência desta alteração e sua associação com as características clínicas.

METODOLOGIA

Inicialmente a metodologia de FISH foi padronizada e até o momento foram analisadas 25 amostras de tumores pediátricos com o diagnóstico histopatológico de RMSa. O fluxograma da metodologia pode ser observado na Figura 1. Os pacientes apresentaram uma média de idade de 11 anos, variando de 5 a 18 anos. A técnica de FISH foi realizada a partir de blocos de parafina, utilizando a sonda LSI FOXO1 (13q14) Dual Color, Break Apart (Vysis) (Figura 2). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa.

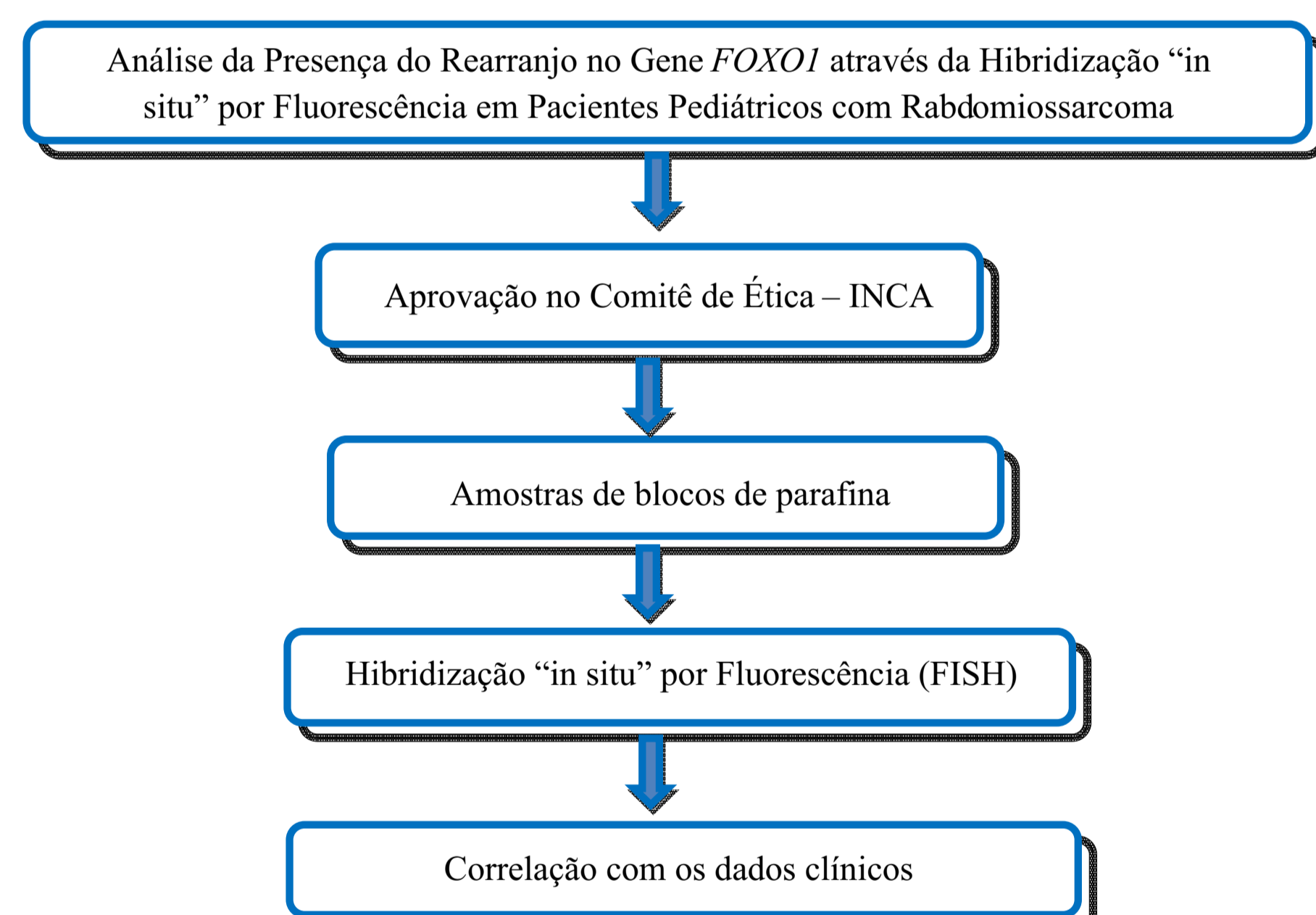


Figura 1: Fluxograma – Metodologia.

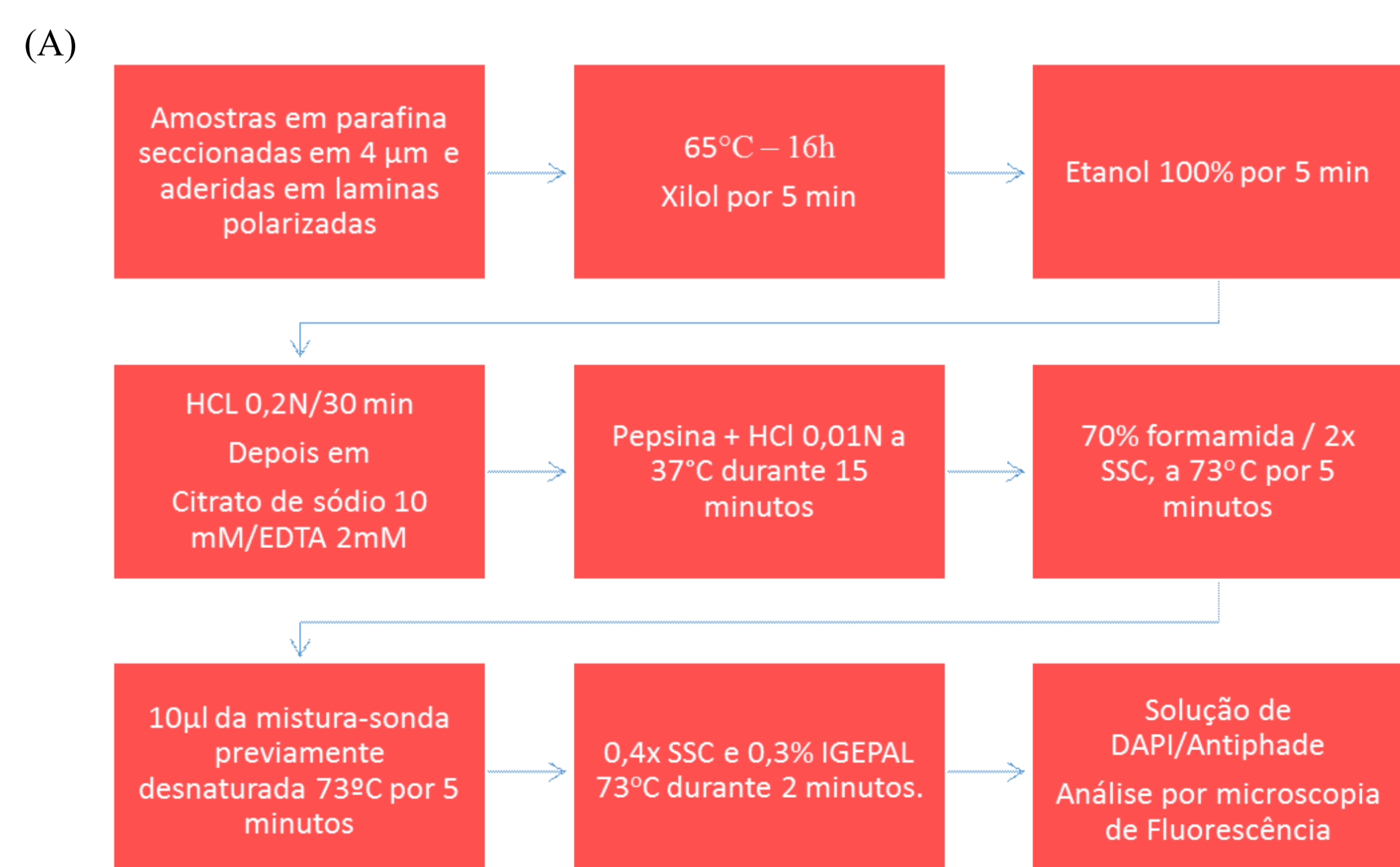


Figura 2: (A) Metodologia do FISH; (B) A sonda LSI FOXO1 (13q14) Dual Color, Break Apart (Vysis).

RESULTADOS

Foram analisadas 25 amostras de tumores, rbdomiossarcomas pediátricos, em blocos de parafina através da hibridização "in situ" por fluorescência (FISH). Alterações cito-moleculares no gene *FOXO1* foram observadas em 76% (19/25) do total de pacientes analisados (Figura 3). Os pacientes apresentaram uma média de idade de 8 anos, variando de 1 a 17 anos. Entre as alterações cito-moleculares encontradas, observamos 12 casos com o rearranjo do gene *FOXO1* (translocação cromossômica), 3 casos com amplificação gênica, e 4 casos com amplificação gênica e translocação cromossômica. Na figura 4 podemos observar as alterações do tipo translocação e cópias extras do gene *FOXO1*.

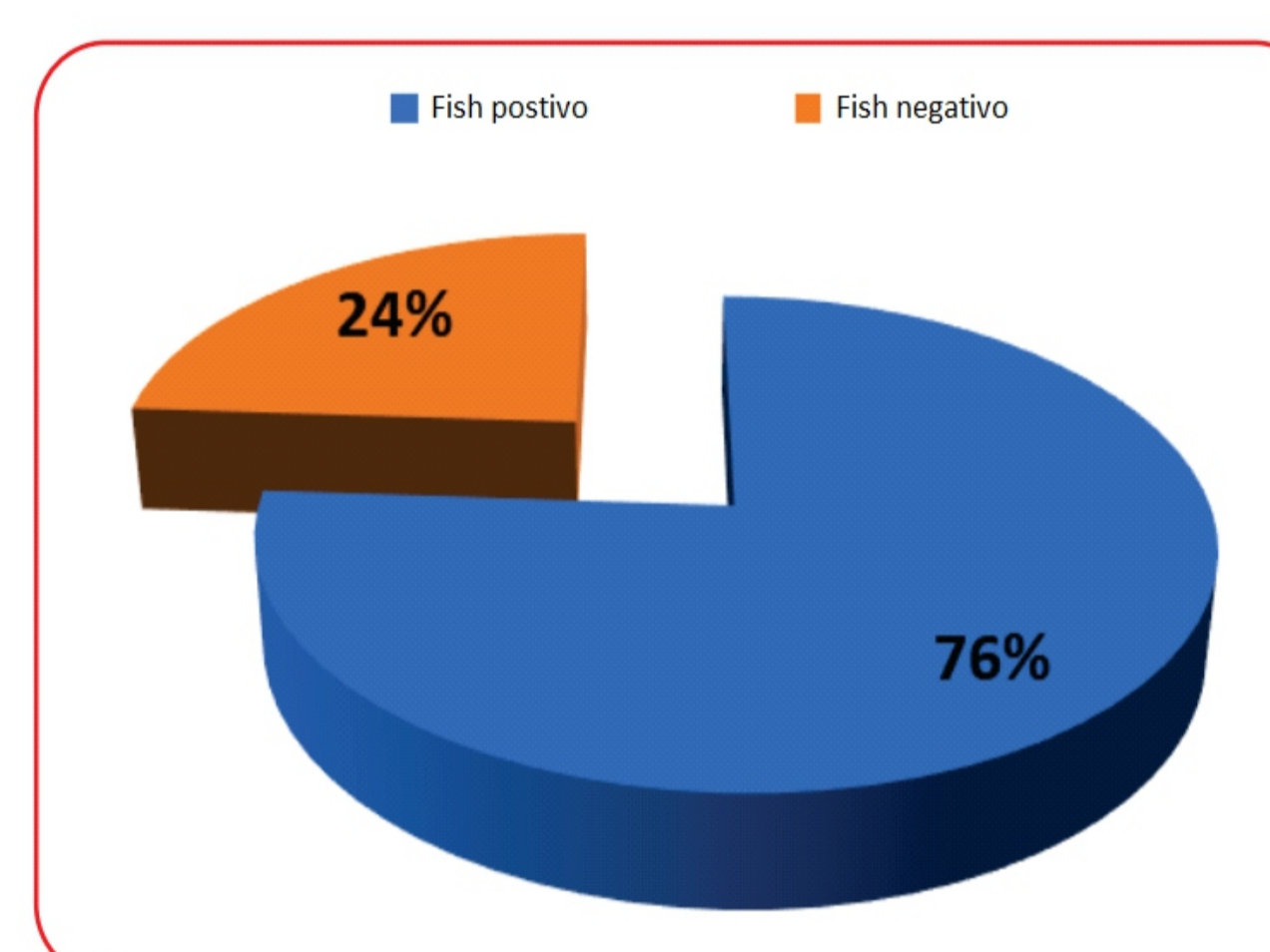


Figura 3: Frequência de alterações cito-moleculares no gene *FOXO1* através da hibridização "in situ" por fluorescência (FISH) em pacientes pediátricos com rbdomiossarcoma alveolar.

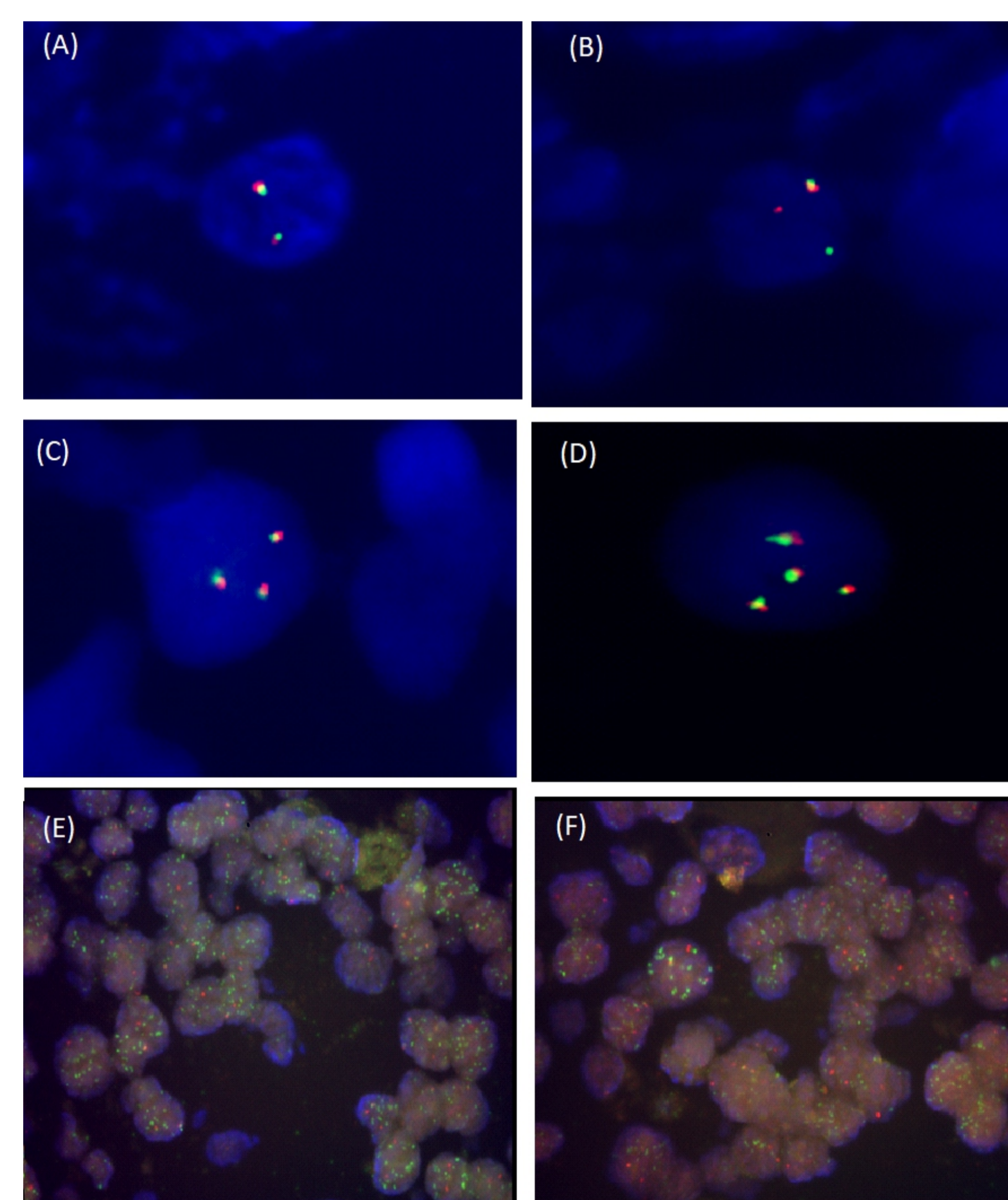


Figura 4: Análise de FISH em pacientes pediátricos com RMSa, mostrando em (A) o gene *FOXO1* com sinal normal; (B) o resultado da sonda do gene *FOXO-1* break-apart demonstra o sinal verde e vermelho separado indicando uma translocação no gene afetado; (C) presença de um sinal extra; (D) dois sinais extras do gene *FOXO-1*; (E) e (F) múltiplos sinais verdes caracterizando uma amplificação e o sinal verde e vermelho separados, resultado de uma translocação.

CONCLUSÃO

A metodologia do FISH utilizando a sonda *FOXO1* é importante para o diagnóstico e prognóstico do RMSa. A classificação histopatológica, e principalmente genética do RMS, tem uma importante aplicação clínica, auxiliando a direcionar o tratamento, reduzindo a exposição a tratamentos intensivos e a seus efeitos colaterais. Nossos resultados confirmam a importância do FISH envolvendo o gene *FOXO1* como um biomarcador de prognóstico e diagnóstico. Através desta pesquisa translacional (da bancada à clínica), estabelecemos um teste de diagnóstico adicional, citogenética molecular – FISH, para os pacientes pediátricos atendidos em nossa instituição - INCA. Pretendemos através desta pesquisa translacional dar continuidade a este estudo para contribuir na caracterização citogenética do RMSa ao diagnóstico e durante o tratamento, beneficiando as crianças com esse tipo de tumor tratadas em nossa instituição.

Auxílio financeiro: INCA – Ministério da Saúde.