

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
MESTRADO

DÉBORAH SOARES BISPO SANTOS SILVA

HAPLÓTIPOS DE DIFERENTES SNPS NO INTERIOR DO
GENE *EWS* EM INDIVÍDUOS AFETADOS E NÃO-AFETADOS
PELO SARCOMA DE EWING

Porto Alegre
Março 2012

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DÉBORAH SOARES BISPO SANTOS SILVA

**HAPLÓTIPOS DE DIFERENTES SNPS NO INTERIOR DO GENE *EWS* EM INDIVÍDUOS
AFETADOS E NÃO-AFETADOS PELO SARCOMA DE EWING**

Orientadora: CLARICE SAMPAIO ALHO

Porto Alegre
2012

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**HAPLÓTIPOS DE DIFERENTES SNPS NO INTERIOR DO GENE EWS EM INDIVÍDUOS
AFETADOS E NÃO-AFETADOS PELO SARCOMA DE EWING**

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Faculdade de
Biotecnologia da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul.

Pós-graduando: DÉBORAH SOARES BISPO SANTOS SILVA

Orientadora: Dra. CLARICE SAMPAIO ALHO

Porto Alegre

2012

Dedico esta Dissertação a minha família, por toda compreensão e apoio e, principalmente aos meus pais, que acreditaram no meu potencial e estiveram sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a minha orientadora Dra. Clarice Sampaio Alho, pelo apoio, dedicação e confiança depositada em mim.

Ao Instituto do Câncer Infantil e Departamento de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por ter me permitido acesso às amostras e oportunidade realizar esta pesquisa.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Biociências da PUCRS, que me acompanharam nesta caminhada de estudos.

A minha amiga e mãe carioca/gaúcha Vânia Caminha pelo carinho e incentivo durante essa minha jornada.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Genética Humana e Molecular em especial, Elisa De Toni, Fernanda Sawitzki, Juliane Picanço, Pietra Graebin, Aline Ponzoni e Paulo Raimann, pela companhia, carinho, amizade e convivência junto a vocês nestes longos tempos de Mestrado.

As minhas amigas Mariana Resende, Gabriela Borin, Fernanda Gueiros e Rayana Schuster, que mesmo distantes foram indispensáveis, me dando muito apoio, carinho e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1- APRESENTAÇÃO DO TEMA	3
1- SARCOMA DE EWING	3
2- CAUSAS MOLECULARES	4
3- TIPO DE HERANÇA E PREDISPOSIÇÃO AO SARCOMA DE EWING	7
4- GENE <i>EWS</i>	9
5- FATOR DE TRANSCRIÇÃO QUIMÉRICO <i>EWS/FLI1</i>	9
6- SNPs NO GENE <i>EWS</i> E O SARCOMA DE EWING	10
7- OBJETIVOS	11
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO 2- ARTIGO CIENTÍFICO	17
CAPÍTULO 3- CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
ANEXO	39

RESUMO

O sarcoma de Ewing foi primeiramente descrito por James Ewing em 1921 e é o segundo tumor ósseo mais frequente em crianças, adolescente e adultos jovens. Neste sarcoma, é comum ocorrer a quebra e a translocação cromossômica. Dentre os genes envolvidos nesta translocação está o gene *EWS*, localizado no cromossomo 22. Entretanto, pouco se sabe a respeito da região de quebra deste gene e quais sequências poderiam levar a uma maior susceptibilidade a quebra cromossômica. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar três polimorfismos de base única (SNPs) presentes na região de quebra do gene *EWS*, em uma população de indivíduos saudáveis e em pacientes afetados pelo Sarcoma de Ewing. A genotipagem para os SNPs selecionados foi realizada usando TaqMan SNP Genotyping Assay pelo sistema de PCR em tempo real. Nós realizamos análises de frequências alélicas e genotípicas, assim como um estudo de associação e de desequilíbrio de transmissão. A comparação das frequências alélicas e genotípicas entre as populações deste estudo e entre populações de projetos já publicados mostrou particularidades entre as populações, revelando a importância de se conhecer tais frequências na população de estudo. Para testar a hipótese de que algum SNP, haplótipo ou combinação específica de SNPs poderia influenciar na susceptibilidade ao Sarcoma de Ewing, comparamos afetados com não-afetados realizando estudos de associação cujos resultados mostraram uma única diferença significativa: a maior incidência no genótipo TT-rs4820804 entre os afetados pelo Sarcoma de Ewing. O Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) comparou os dados dos pacientes afetados e os dados de seus familiares, mas nenhum resultado significativo foi encontrado. Em conclusão, o genótipo TT-rs4820804 pode estar associado ao Sarcoma de Ewing e o SNP rs4820804 pode ser candidato para auxílio do entendimento da susceptibilidade de quebra do gene *EWS*.

PALAVRAS-CHAVE: SNP, rs2301291, rs4820803, rs4820804, Sarcoma de Ewing.

ABSTRACT

Ewing's sarcoma was first described by James Ewing in 1921 and it is the second most common bone tumor in children and young adults. Both chromosomal breakage and translocation occur in this sarcoma. The *EWS* gene is localized in chromosome 22 and is involved in this translocation. However, little is known about this gene breaking region and what sequences could be involved in higher chromosomal break susceptibility. In this study we aimed to investigate three SNPs in the *EWS* gene breaking region in a healthy subjects' population and in Ewing's sarcoma patients. Genotyping was performed by TaqMan® assay for allelic discrimination using Real-Time PCR System. We conducted analysis of allelic and genotypic frequencies, as well as association and transmission disequilibrium tests. According to our results, the control group showed similar and different genotypes distribution of all SNPs when compared to other populations studied by different projects, which shows how important it is to know the frequencies of our population. To test the hypothesis that some SNP, SNP-arrangement or haplotype could influence in the susceptibility to develop Ewing's sarcoma, we compared affected with non-affected individuals using association studies. The results showed one significant difference: a higher presence of homozygote T-rs4820804 in Ewing's Sarcoma patients. Transmission Disequilibrium Test (TDT) was performed to compare data from Ewing's Sarcoma patients and from their families but no statistically significant result was found. In conclusion, we find that the TT-rs4820804 *EWS* genotype can be associate with Ewing's sarcoma and that the rs4820804 SNP can be a candidate to understand the *EWS* breakage susceptibility.

KEYWORDS: SNP, rs2301291, rs4820803, rs4820804, Ewing's sarcoma.

CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO DO TEMA

INTRODUÇÃO

1- Sarcoma de Ewing

A família de Tumores de Ewing compreende um espectro de neoplasias de células neuroectodérmicas primitivas que acometem primariamente o tecido ósseo e tecidos moles (Ferman, 2010). O sarcoma de Ewing ósseo corresponde a 87% dos tumores classificados dentro dessa família, seguido do sarcoma extra-ósseo (8%) e do tumor neuroectodérmico primitivo periférico (5%) (Horowitz *et al.*, 1997).

O sarcoma de Ewing foi primeiramente descrito por James Ewing em 1921 como um endotelioma difuso de osso e, atualmente, é considerado altamente maligno e metastático (Randall *et al.*, 2010). É o segundo tumor ósseo mais comum de ocorrência em crianças, adolescentes e jovens adultos, representando de 10–15% de todos os tumores ósseos primários (Huvos, 1991; Burchill, 2003).

Este sarcoma pode afetar qualquer osso, mas os locais mais comuns são as extremidades inferiores (45%), seguido pela pélvis (20%), extremidades superiores (13%), esqueleto axial e costelas (13%), e face (2%) (Grier, 1997; Burchill, 2003). O fêmur é o osso mais frequentemente afetado, no entanto, qualquer região óssea pode ser acometida (Burchill, 2003). É um sarcoma ligado à etnia, tendo uma distribuição desigual, com 96% dos casos ocorrendo em caucasianos, 1,8% em africanos e 2,2% em outras etnias (Parkin *et al.*, 1993).

A incidência do sarcoma de Ewing é menor que 1 em um milhão nas populações do Leste e Sudeste Asiático, países Africanos e em Afro-Americanos. Taxas intermediárias de 1-2 em um milhão são encontradas em Cuba, Porto Rico e em populações hispânicas dos Estados Unidos. Nos países ocidentais, a incidência na população caucasiana é de cerca de 2-3 em um milhão (Tortajada *et al.*, 2005).

Para este sarcoma, um grande fator prognóstico é a presença ou a ausência de metástase. As metástases são detectadas no momento do diagnóstico em cerca de 15-25% dos casos e é um sinal de prognóstico fraco (Terrier *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 2000). A detecção

da doença disseminada é baseada no estudo de imagens que apenas revelam lesões macroscópicas, e/ou análise histológica da medula óssea, que é limitada pela falta de marcadores específicos para as células com sarcoma de Ewing (Fidelia-Lambert *et al.*, 1999). Sendo assim, marcadores cromossômicos seriam de bastante ajuda para um diagnóstico preciso.

Apesar das melhorias nos resultados para os pacientes com tumores localizados, o tratamento para aqueles que têm doença metastática permanece insatisfatório, com sobrevivência global a longo prazo abaixo de 30%, mesmo com a intensificação da dose significativa de terapias citotóxicas (Grier *et al.*, 2003; Miser *et al.*, 2004; Miser *et al.*, 2007; Womer *et al.*, 2008; Dubois *et al.*, 2010). Protocolos combinando controle sistemático por quimioterapia com controle local por cirurgia e/ou radioterapia têm melhorado drasticamente as taxas de sobrevivência (Picci *et al.*, 1997; Wunder *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2000).

2- Causas moleculares

Em torno de 88% a 95% dos casos verifica-se a ocorrência de uma translocação entre o gene *EWS* (lócus 22q12) e dois membros da família do fator de transcrição *ETS*: o *FLI1* (11q24) ou o *ERG* (21q22) (Zucman-Rossi *et al.*, 1997; Rerim, 2000). A translocação mais freqüente envolve os genes *EWS* e *FLI1*, a qual ocorre em aproximadamente 85% dos casos, seguida pela translocação do *EWS* com o gene *ERG*, a qual ocorre em cerca de 5-10% dos casos (Tabela 1) (Delattre *et al.*, 1992; Sorensen *et al.*, 1993; Zucman *et al.*, 1993; Ozaki *et al.*, 2002).

Tabela 1 – Tipos de translocações cromossômicas envolvendo o gene *EWS* descritos na Família de Tumores de Sarcoma de Ewing (ESFT)*.

Translocação	Fusão gênica	Tipo de tumor (% de tumores com rearranjo envolvendo o gene <i>EWS</i>)
t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	ESFT (85%)
t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG	ESFT (10%)
t(7;22)(p22;q12)	EWS-ETV1	ESFT (rare)
t(17;22)(q12;q12)	EWS-E1AF	ESFT (rare)
t(2;22)(q33;q12)	EWS-FEV	ESFT (rare)

*(Retirado de Burchill, 2003)

A fusão entre os genes membros das famílias *EWS* e *ETS*, decorrente da translocação, é um evento oncogenético chave que ocorre nos tumores Ewing. O resultado é a formação de um fator de transcrição quimérico aberrante a partir da ligação do aminoácido terminal do *EWS*, que se apresenta como um fator ativador da transcrição, com a região carboxi-terminal de *FLI1* ou *ERG* (Figura 1) (Delattre *et al.*, 1992; Guillon *et al.*, 2009). Esse fator de transcrição aberrante regula genes envolvidos no fenótipo tumorigênico do sarcoma de Ewing e apresenta uma atividade transcrricional aumentada quando comparado ao normal *FLI1* (Burchill, 2003; Gangwal *et al.*, 2008).

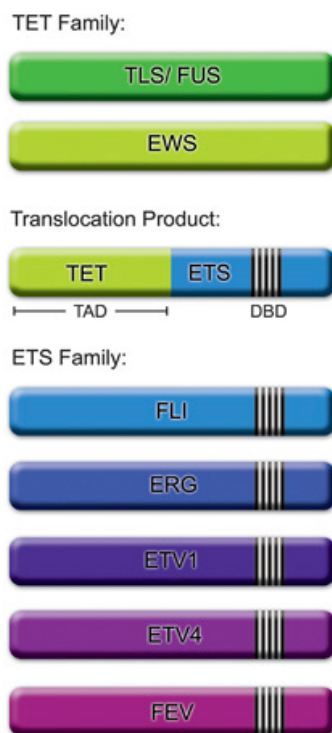


Figura 1- Organização da fusão proteica do sarcoma de Ewing. O produto de translocação do sarcoma de Ewing é o resultado de um rearranjo cromossômico que envolve o domínio de ativação transcricional N-terminal (TAD) de um membro da família *TET* (mais comumente o *EWS*) e a porção C-terminal de um membro da família *ETS* (*FLI*, *ERG*, *ETV1*, *ETV4* ou *FEV*), incluindo o domínio de ligação a DNA *ETS* (DBD) (Toomey *et al.*, 2010).

Segundo Lin *et al.* (1999), formas alternativas dos genes quiméricos existem devido às variações dos locais de quebra cromossômica do *EWS* e *FLI1*, resultando em um grande número de translocações diferentes, ocasionando um grupo heterogêneo de translocações. A forma mais comum, designada 'Tipo 1', consiste nos primeiros 7 exons do *EWS* unidos com

exons 6-9 do gene *FLI1*, que ocorrem em aproximadamente 60% dos casos (Figura 2). Dessa forma, Ginsberg *et al.* (1999) investigaram se dois produtos de fusão dos genes alternativos, *EWS/FLI1* e *EWS/ERG*, definiriam diferentes características clínicas. Entretanto, de acordo com os resultados obtidos, nenhuma diferença clínica significativamente diferente foi observada entre os dois grupos.

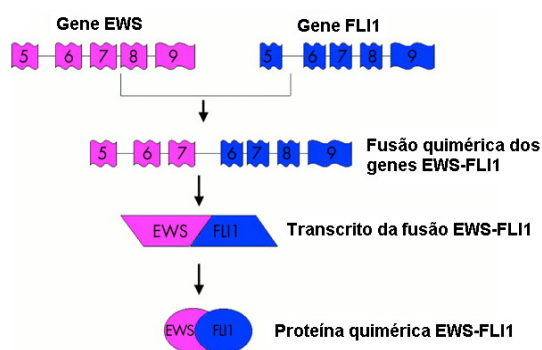


Figura 2– Representação da forma mais comum dos locais de quebra e fusão dos genes *EWS* e *FLI1* (adaptada de Burchill, 2003).

Na família dos tumores de Ewing também podem ocorrer outras variantes (Figura 3), mas em menor escala. Num pequeno grupo de tumores (menos de 10%), ocorre fusão entre o gene *EWS* e outros membros da família *ETS*: *ETV1*, *E1A3*, *EIAF* e *FEV*, além de translocações mais complexas que envolvem múltiplos cromossomos como $t(11;14;22)(q24;q11;q12)$ e $t(10;11;22)(p11.2;q24;q12)$ (Zucman-Rossi *et al.*, 1997; Fidelia-Lambert *et al.*, 1999; Burchill, 2003). Outras anormalidades cromossômicas têm sido descritas, entretanto elas são menos frequentemente descritas do que os rearranjos com os genes *EWS-ETS* e suas implicações clínicas são menos entendidas. Elas consistem em aberrações tanto numéricas quanto estruturais, incluindo ganho dos cromossomos 8 e 12, translocação desbalanceada $t(1;16)$, e deleções no braço curto do cromossomo 1 (Mugneret *et al.*, 1988; Armengol *et al.*, 1997; Kovar *et al.*, 1997; Zielenska *et al.*, 2001; Burchill, 2003).

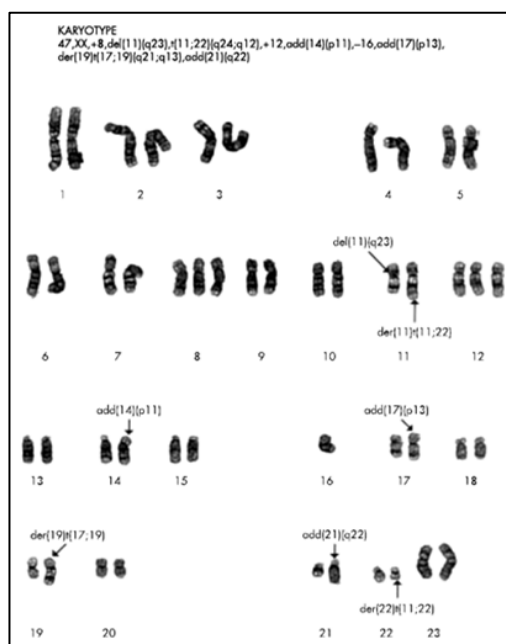


Figura 3– Variantes de anormalidades cromossômicas encontradas em pacientes portadores de sarcoma de Ewing (Burchill, 2003).

3- Tipo de herança e predisposição ao sarcoma de Ewing

Apesar de algumas causas moleculares já terem sido descritas em relação ao sarcoma de Ewing, pouco ou quase nada se sabe sobre o tipo de herança dessa doença. Este tipo de câncer já foi descrito entre irmãos, porém esse fato é bastante raro e essa doença parece não fazer parte das síndromes de câncer familiar (Hutter *et al.*, 1964; Zamora *et al.*, 1986; Burchill, 2003). De acordo com Randall *et al.* (2010), casos de pacientes afetados pelo sarcoma de Ewing são reportados, na maioria das vezes, como sendo isolados, no entanto existem três citações de ocorrências publicadas em relação a irmãos serem portadores de Ewing e, interessantemente, todos envolvendo indivíduos do sexo feminino. O fato de existirem irmãos, portadores do sarcoma de Ewing pode implicar uma leve, mas sugestiva contribuição da genética herdada para o risco de desenvolver a doença (Randall *et al.*, 2010).

Outra informação sugestiva de contribuição da genética para o sarcoma de Ewing pode ser observada devido ao fato de populações Afro-Caribenhas e Chinesas serem menos frequentemente afetadas do que a populações de etnia caucasiana, o que revelaria o efeito de um *background* genético e de frequências alélicas de suscetibilidade diferencial e dependente

da origem étnica (Joyce *et al.*, 1984; Zamora *et al.*, 1986; Burchill, 2003; Randall *et al.*, 2010). Entretanto, devido à dificuldade de se obter DNA genômico direto de células tumorais Ewing para realização de análises mais refinadas, e também se levando em conta o número limitado de publicações a respeito desses casos, as contribuições ambientais à herança genética devem ser consideradas no momento de se atribuir as probabilidades de ocorrência do sarcoma de Ewing.

Zucman-Rossi *et al.* (1997) investigaram a especificidade étnica do sarcoma de Ewing analisando possíveis variações inter-étnicas da região de quebra do gene *EWS*, e encontraram uma rara deleção de repetições Alu raça-específica no intron 6, que ocorreu exclusivamente em negros. De acordo com este trabalho, o intron 6 no gene *EWS* apresenta uma grande densidade de elementos Alu (65%), mas em indivíduos de origem africana o tamanho deste intron diminui em cerca de 50% como resultado de uma recombinação homóloga entre duas sequências Alu (Zucman-Rossi *et al.*, 1997; Ozaki *et al.*, 2002). A variabilidade das repetições Alu pode estar envolvida na estabilização e na estruturação dos cromossomos.

Este resultado poderia sugerir que a presença do alelo mutante mais recente (mutação derivada ocorrida apenas entre indivíduos da população negra africana) pode explicar a proteção genética dos negros africanos ao sarcoma de Ewing. Na avaliação analítica se deve levar em conta que no trabalho de Zucman-Rossi *et al.* foram estudados mais indivíduos negros africanos que brancos europeus, e que a mutação derivada (mais recente) se apresentou em somente 8% dos indivíduos oriundos da população negra. Dessa forma, apenas um pequeno número de indivíduos estaria protegido, não sendo essa a única ou verdadeira razão para explicar a discrepância étnica da incidência do sarcoma de Ewing.

Outra análise revela que a maioria das translocações observadas nos portadores de sarcoma de Ewing ocorre no intron 7 do gene *EWS*, e não no intron 6, onde estão as inserções Alu, não explicando completamente, portanto, o papel da variabilidade Alu na diferença racial observada para prevalência do tumor. Sendo assim, outros elementos genéticos deverão poder explicar a incidência desproporcional do sarcoma de Ewing em relação à etnia (Zucman-Rossi *et al.*, 1997; Kovar, 1998).

4- Gene *EWS*

Esse gene tem como símbolo oficial *EWSR1* (Ewing sarcoma breakpoint region 1 - *Homo sapiens*) e está localizado no cromossomo 22 na banda citogenética 12.2 (GeneID 2130) (*EWS Homo sapiens*, 2010).

O gene *EWS* tem tamanho aproximado de 33 kb e 17 exons, sendo que os primeiros 7 exons codificam o domínio N-terminal, e os exons 11, 12 e 13 codificam um domínio para ligação de RNA. Esse gene codifica uma proteína multifuncional que está envolvida em vários processos celulares, incluindo expressão gênica, sinalização celular e processamento e transporte de RNA. Translocações cromossomais entre esse gene e vários genes que codificam fatores de transcrição resultam na produção de proteínas quiméricas que estão envolvidas na tumorigênese, como no caso do sarcoma de Ewing. *Splicing* alternativos neste gene resultam em múltiplas variantes transcritas (*EWS Homo sapiens*, 2010).

5- Fator de transcrição quimérico *EWS/FLI1*

A fusão entre os genes *EWS* e *FLI1* leva à formação de um potente e altamente expresso fator de transcrição aberrante que ativa um programa oncogênico nas células de origem do tumor (Ludwig, 2008; Jedlicka, 2010).

A fusão resulta em um ganho multifuncional na regulação da transcrição, com o fator de transcrição quimérico formado sendo capaz de ativar e reprimir a expressão de diversos genes, resultando em efeitos importantes na oncogênese do sarcoma de Ewing (Jedlicka, 2010).

EWS/FLI1 ativa alguns genes-alvo diretamente, através de sítios de ligação de DNA (EBS) ou por meio de microssatélites GGAA [(GGAA)_n]. Alguns genes-alvo são co-regulados (ativados ou reprimidos) com o co-regulador transcricional *NROB1* (também capaz de induzir o gene *EWS/FLI1*). *EWS/FLI1* também pode reprimir alguns genes-alvo diretamente, através de sítios de ligação de DNA (EBS). Outros mecanismos de repressão de genes-alvo são a indução do repressor da transcrição *Nkx2.2* e a indução da histona metiltransferase *EZH2*. Fusões *EWS/FLI1* também podem regular a expressão de genes-alvo através de mecanismos não-

transcricionais, incluindo o processamento do RNA (Owen et al., 2008; Riggi et al., 2008; Kinsey et al., 2009; Jedlicka, 2010; Toomey et al., 2010) (Figura 4).

Esse fator de transcrição quimérico também pode afetar o splicing de RNA, além de interagir com outras proteínas transcricionalmente relevantes, como a RNA Helicase A (Chansky et al., 2001; Knoop & Baker, 2001; Toretsky et al., 2006; Jedlicka, 2010).

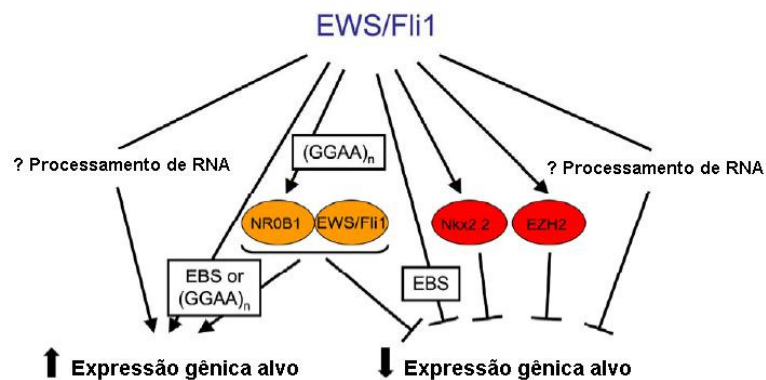


Figura 4– Efeitos importantes na oncogênese do sarcoma de Ewing resultantes da fusão entre os genes *EWS* e *FLI1* que forma um fator de transcrição quimérico capaz de ativar e reprimir a expressão de diversos genes (Jedlicka, 2010).

6- SNPs no gene *EWS* e o Sarcoma de Ewing

A grande variação do fenótipo humano é causada por fatores genéticos (intrínseco) e não-genéticos (extrínsecos ou ambientais), tendo muitos fenótipos clínicos um considerável componente genético, como as variantes genômicas de SNPs (*single nucleotide polymorphism*). SNPs são polimorfismos de substituição de um único nucleotídeo existentes na população, onde o alelo mais raro tem uma frequência de pelo menos 1%. Muitas doenças comuns (doenças completas e multifatoriais) na população como câncer, doenças cardiovasculares, doenças mentais e diabetes podem ser influenciadas pelos padrões dos SNPs que o indivíduo possui em determinados genes-chave para a doença. Dessa forma, se um fator apresenta uma associação clínica, então este fator deve ser encontrado com uma maior frequência em indivíduos afetados pela doença, quando comparados com indivíduos não-afetados (Brookes, 1999).

Para a busca e análise dessas variantes polimórficas herdadas, existem metodologias que avançaram muito recentemente e estão disponíveis no domínio público. Os bancos de dados de SNPs existentes atualmente provêm informações detalhadas de SNPs relacionados a genes de diversas espécies, incluindo genes humanos.

O *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) é um dos institutos do *United States National Institutes of Health* (NIH) e tem sido o principal local de depósito mundial de dados genômicos dos últimos anos. O banco de dados das variações das sequências de nucleotídeos presente no NCBI é conhecida como *SNP database* (dbSNP) e contém a maior coleção de SNPs disponíveis com o maior número de dados e informações adicionais para cada *locus* (Phillips, 2007).

Através do site do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/), é possível encontrar SNPs de diversos genes que já foram estudados, validados, mas sem nenhum estudo feito em relação a associações clínicas. Em relação ao Sarcoma de Ewing, não há conhecimento em relação ao risco à translocação em pacientes com esta doença, ainda que o projeto HapMap já tenha avaliado SNPs no gene *EWS*.

7- Objetivo

O objetivo deste trabalho foi estudar as variantes polimórficas do tipo SNP no gene *EWS* em indivíduos afetados e não afetados pelo Sarcoma de Ewing. Especificamente, pretendeu-se:

1. Selecionar os SNPs presentes no gene *EWS* mais informativos segundo a frequência dos alelos nas populações e o seu efeito fenotípico.
2. Genotipar os SNPs selecionados em amostras de DNA provenientes de pacientes afetados pelo Sarcoma de Ewing, nos indivíduos aparentados ao afetado (pai, mãe e irmãos), bem como em amostras de DNA proveniente de indivíduos não afetados pelo Sarcoma de Ewing (população controle).
3. Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos SNPs do gene *EWS* no grupo de afetados e na população controle.

4. Comparar as frequências genótípicas, alélicas e haplotípicas entre os grupos de indivíduos afetados e controles.
5. Analisar a segregação de alelos e haplótipos entre geração parental e filial afetada verificando se há desequilíbrio de transmissão entre as gerações.

8- Referências Bibliográficas

- Armengol G, Tarkkanen M, Virolainen M, Forus A, Valle J, Bohling T, et al. Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridisation. *Br J Cancer*. 1997; 75: 1403–09.
- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999; 234: 177-86.
- Burchill SA. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J Clin Pathol*. 2003; 56: 96–102.
- Chansky HA, Hu M, Hickstein DD, Yang L. Oncogenic TLS/ERG and EWS/FLI-1 fusion proteins inhibit RNA splicing mediated by YB-1 protein. *Cancer Res*. 2001; 61(9): 3586-3590.
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, et al. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature*. 1992; 359: 162–65.
- DuBois SG, Marina N, Glade-Bender J. Angiogenesis and Vascular Targeting in Ewing Sarcoma - A Review of Preclinical and Clinical Data. *Cancer*. 2010: 749-757.
- EWS *Homo sapiens*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=EWS+homo+sapiens>. Acesso em: maio de 2010
- Ferman S. Família de Tumores de Ewing: Sarcoma de Ewing e Tumores Neuroectodérmicos Primitivos Periféricos (Askin). Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=345. Acesso em: maio de 2010.
- Fidelia-Lambert MN, Zhuang Z, Tsokos M. Sensitive Detection of Rare Ewing's Sarcoma Cells in Peripheral Blood by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Hum Pathol*. 1999; 30(1): 78-80.

Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, Kinsey M, Haroldsen SC, Shah AA, et al. Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. PNAS. 2008; 105(29): 10149–154.

Ginsberg JP, Alava E, Ladanyi M, Wexler LH, Kovar H, Paulussen M, et al. EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. J Clin Oncol. 1999; 17: 1809-14.

Grier HE. The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. Pediatr Clin North Am. 1997; 44: 991–1104.

Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. N Engl J Med. 2003; 348: 694-701.

Guillon N, Tirode F, Boeva V, Zynovyev A, Barillot E, Delattre O. The Oncogenic EWS-FLI1 Protein Binds *In Vivo* GGAA Microsatellite Sequences with Potential Transcriptional Activation Function. Plos One. 2009; 4(3): 1-8.

Horowitz ME, Malawer MM, Woo SY, et al. Ewing's family of tumors: Ewing's sarcoma of the bone and soft tissue and the peripheral primitive neuroectodermal tumors. In: Principles and Practice of pediatric Oncology. 3rd ed. Philadelphia: Lippencot-Raven; 1997. p. 831-63.

Hutter RVP, Francis KC, Foote FW. Ewing's sarcoma in siblings. Am J Surg. 1964; 107:598-603.

Huvos AG. Ewing's sarcoma. In: Bone tumors: diagnosis, treatment and prognosis. 2nd ed. Philadelphia: Sanders; 1991. p. 523–52.

Jedlicka P. Ewing sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions. Int J Clin Exp Pathol. 2010; 3(4): 338-347.

Joyce MJ, Harmon DC, Mankin HJ, Suit HD, Schiller AL, Truman JT. Ewing's sarcoma in female siblings: a clinical report and review of the literature. Cancer. 1984; 53: 1959–62.

Kinsey M, Smith R, Iyer AK, McCabe ER, Lessnick SL. EWS/FLI and its downstream target NR0B1 interact directly to modulate transcription and oncogenesis in Ewing's sarcoma. Cancer Res. 2009; 69: 9047-9055.

Knoop LL, Baker SJ. EWS/FLI alters 5'-splice site selection. J Biol Chem. 2001; 276(25): 22317:22322.

- Kovar H. Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union. *Curr Opin Oncol.* 1998; 10: 334-42.
- Kovar H, Jug G, Aryee DN, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, Windhager R, Gadner H. Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene.* 1997; 15: 2225-32.
- Lin PP, Brody RI, Hamelin AC, Bradner JE, Healey JH, Ladanyi M. Differential transactivation by alternative EWS-FLI1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 1999; 59: 1428-32.
- Ludwig JA. Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Curr Opin Oncol.* 2008; 20(4): 412-418.
- Miser JS, Krailo MD, Tarbell NJ. Treatment of metastatic Ewing's sarcoma or primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of combination ifosfamide and etoposide - a Children's Cancer Group and Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 2873-2876.
- Miser JS, Goldsby RE, Chen Z. Treatment of metastatic Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of bone: evaluation of increasing the dose intensity of chemotherapy - a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2007; 49: 894-900.
- Mugneret F, Lizard S, Aurias A, Turc-Carel C. Chromosomes in Ewing's sarcoma. II. Nonrandom additional changes, trisomy 8 and der(16)t(1;16). *Cancer Genet Cytogenet.* 1988; 32: 239-45.
- Ozaki T, Schaefer KL, Wai D, Yokoyama R, Ahrens S, Diallo R, et al. Population-based genetic alterations in Ewing's tumors from Japanese and European Caucasian patients. *Ann Onco.* 2002; 13: 1656-64.
- Owen LA, Kowalewski AA, Lessnick SL. EWS/FLI1 mediates transcriptional repression via NKX2.2 during oncogenic transformation in Ewing's sarcoma. *PLoS One.* 2008; 3: e1965.
- Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J. International variations in the incidence of childhood bone tumors. *Int J Cancer.* 1993; 53: 371-76.

- Picci P, Bohling T, Bacci G, Ferrari S, Sangiorgi L, Mercuri M. Chemotherapy-induced tumor necrosis as a prognostic factor in localized Ewing's sarcoma of the extremities. *J Clin Oncol.* 1997; 15: 1553–1559.
- Phillips C. Online Resources for SNP Analysis: A Review and Route Map. *Mol Biotechnol.* 2007; 35: 65-97.
- Randall RL, Lessnick SL, Jones KB, Gouw LG, Cummings JE, Cannon-Albright L, Schiffman JD. Is there a predisposition gene for Ewing's Sarcoma? *J Oncol.* 2010; 2010: 1-6.
- Rerin JS. Analysis of Ewing tumors by Comparative Genomic Hybridization (CGH). Münster: Universidade Westfälische Wilhelms – Faculdade de Medicina; 2000.
- Riggi N, Suva ML, Suva D, Cironi L, Provero P, Tercier S, Joseph JM, Stehle JC, Baumer K, Kindler V, Stamenkovic I. EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res.* 2008; 68: 2176-2185.
- Sorensen PH, Liu XF, Delattre O, Rowland JM, Biggs CA, Thomas G, Triche TJ. Reverse transcriptase PCR amplification of *EWS/FLI-1* fusion transcripts as a diagnostic test for peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Diagn Mol Pathol.* 1993; 2: 147–57.
- Terrier P, Llombart-Bosch A, Contesso G. Small round blue cell tumors in bone: prognostic factors correlated to Ewing's sarcoma and neuroectodermal tumors. *Semin Diagn Pathol.* 1996; 13: 250–257.
- Toomey EC, Schiffman JD, Lessnick SL. Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma. *Oncogene.* 2010; 29: 4504-4516.
- Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, Abaan OD, Parvin JD, Cripe TP, Rice AM, Lee SB, Uren A. Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. *Cancer Res.* 2006; 66(11): 5574-5581.
- Tortajada JF, Tornero OB, García JAO, Claudio-Morales L, Castell JG, Perales VM, Casas LM. Factores de riesgo para los tumores óseos malignos pediátricos. *Na Pediatr.* 2005; 63: 537-47.
- Wei G, Antonescu CR, Alava E, Leung D, Huvos AG, Meyers PA, Healey JH, Ladanyi M. Prognostic Impact of INK4A Deletion in Ewing Sarcoma. *Cancer.* 2000; 89(4): 793-799.

- Womer RB, West DC, Krailo MD, Dickman P, Pawel B for the Children' Oncology Group AEWS0031 Committee. Randomized comparison of every-2-week v. every-3-week chemotherapy in Ewing sarcoma family tumors (ESFT) [abstract]. *J ClinOncol.* 2008;26(May 20 suppl). Abstract 10504.
- Wunder JS, Paulian G, Huvos AG, Heller G, Meyers PA, Healey J. The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am.* 1998; 80A: 1020-1033.
- Zamora P, Garcia de Paredes ML, Baron GM, Diaz MA, Escobar Y, Ordonez A, Barea FL, Gonzalez JM. Ewing's tumor in brothers: An unusual observation. *Am J Clin Oncol.* 1986; 9: 358-60.
- Zielenska M, Zhang ZM, Ng K, Marrano P, Bayani J, Ramirez OC, et al. Acquisition of secondary structural chromosomal changes in pediatric Ewing sarcoma is a probable prognostic factor for tumor response and clinical outcome. *Cancer.* 2001; 91: 2156-64.
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, et al. Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing's family of tumours. *EMBO J.* 1993; 12: 4481-87.
- Zucman-Rossi J, Batzer MA, Stoneking M, Delattre O, Thomas G. Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination. *Hum Genet.* 1997; 99: 357-63.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO

(Manuscrito submetido ao periódico "JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY")

MANUSCRIPT TITLE

EWING'S SARCOMA: ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN THE *EWS* GENE

AUTHORS, AFFILIATIONS AND ADDRESSES

Deborah S. B. S. Silva: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Elisa C. De Toni: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Fernanda R. Sawitzki: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Ana Lucia Abujamra: Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; National Institute for Translational Medicine, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology Unit, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; Medical Sciences Program, School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul.

Caroline B. de Farias: Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; National Institute for Translational Medicine, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology Unit, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Pietra Graebin: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Juliane B. Picanço: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

Rafael Roesler: Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil; Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; National Institute for Translational Medicine, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Algemir L. Brunetto: Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; National Institute for Translational Medicine, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil; Children's Cancer Institute and Pediatric Oncology Unit, Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Clarice S. Alho: Laboratory of Molecular and Human Genetics, Faculty of Biosciences, PUCRS, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

CORRESPONDING AUTHOR

Clarice Sampaio Alho: csalho@pucrs.br; Phone/Fax: (+55) (51) 3320-3568.

ABSTRACT

Purpose: In this study, we aimed to investigate the *EWS* gene breaking region to see if some sequences could be involved in higher chromosomal break susceptibility.

Methods: We investigated three SNPs in the *EWS* gene breaking region in a healthy subjects' population and in Ewing's sarcoma patients from South Brazil. Genotyping was performed by TaqMan® assay for allelic discrimination using Real-Time PCR System. We conducted analysis of allelic and genotypic frequencies, as well as association transmission disequilibrium tests.

Results: According to our results, the control group showed similar and different genotypes

distribution of all SNPs when compared to other populations studied by different projects. Also, the investigation to find if some SNP or SNP-arrangement could have different incidence in affected individuals revealed a higher presence of homozygote TT-rs4820804 in Ewing's Sarcoma patients. Transmission disequilibrium test comparing data from Ewing's Sarcoma patients and from their families was performed but no statistically significant result was found. **Conclusion:** We find that the TT-rs4820804 *EWS* genotype can be associate with Ewing's sarcoma and that the rs4820804 SNP can be a candidate to understand the *EWS* breakage susceptibility.

KEYWORDS

SNP, rs2301291, rs4820803, rs4820804, Ewing's sarcoma.

INTRODUCTION

Ewing's sarcoma was first described by James Ewing in 1921 and is currently considered as a highly malignant and metastatic sarcoma that primarily affects bone and soft tissues (Randall et al. 2010). It is the second most common bone tumor occurring in children, adolescents and young adults, accounting for 10-15% of all primary bone tumors (Huvos 1991; Burchill 2003). The clinic diagnostic is usually confirmed by imaging studies and histological analysis of bone marrow and/or tumor sample (Fidelia-Lambert et al. 1999). Imaging analysis show the tumor mass, but the histological examination is until so far limited by the lack of specific markers for cells with Ewing's sarcoma. Clinically, patients were affect any bone, but the most common sites are the lower extremities (45%), followed by the pelvis (20%), upper extremities (13%), axial skeleton and ribs (13%) and face (2%) (Grier 1997; Burchill 2003).

Around 88% to 95% of all Ewing's sarcoma was caused by a translocation between the *EWS* gene (locus 22q12) and two family gene members of the ETS transcription factor: *FLI1* (11q24) or *ERG* (21q22) (Zucman-Rossi et al. 1997; Rerim 2000). The most common translocation involves the *EWS* and *FLI1* genes, which occurs in approximately 85% of cases, followed by translocation of *EWS* with the *ERG* gene, which occurs in about 5-10% of cases (Delattre et al. 1992; Sorensen et al. 1993; Zucman et al. 1993; Ozaki et al. 2002). The tumor development is explained because the fusion between the *EWS* and *FLI1* genes leads to the formation of a potent and highly expressed aberrant transcription factor. This chimeric *EWS/FLI1* transcription factor is able to activate and/or repress the expression of various oncogenes (Ludwig 2008; Jedlicka 2010). The *EWS* gene breakpoint is between exons 1 and 7 (Burchill 2003) and into this region has been described a significant number of single nucleotide polymorphisms (SNPs).

Little is known about the *EWS* gene breaking region. Our hypothesis is that some sequences could promote higher chromosomal break susceptibility. Here, we investigated SNPs into the *EWS* gene breaking region in a healthy subjects' population and in Ewing's sarcoma patients from South Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Our control subjects were about 200 apparently healthy DNA donors from South Brazilian population. Southern Brazil is composed by a singular genetic background: majority of subjects with European origin (Portuguese, Italians, Spanish, and Germans ancestry) and a small amount of individuals with African traits contributing to their genetic pool (Salzano and Freire-Maia 1970; Parra et al. 2003). We also enrolled in this study 24 Ewing's sarcoma patients (geographically matched with control group) and 54 of their family members, including parents and siblings. This study was approved by Ethics Committee (Protocol # 11/05424), and informed consent was obtained from all participants.

Patients Phenotyping

The Ewing's sarcoma patients were diagnosed in the Pediatric Oncology Department, Porto Alegre Clinic Hospital (HCPA). Of the 24 patients, 14 (58.3%) are female and 10 (41.7%) are male, median age of 11, range from 1 to 21 years old. The clinic diagnostic was confirmed by X-rays images, exploratory surgeries, or cell biopsies of muscle, tumor, bone marrow and/or cerebrospinal fluid obtained from lumbar puncture (Table 1-A.) The majority of tumors were located in lower extremity bones (45.8%) (Table 1-B).

Selection of SNPs

The selection of SNPs was based in three criteria: SNP inside the *EWS* gene break point region; SNP that had been validated and/or functionally tested; and SNP described in HapMap dbSNP (SNP DataBase – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) with rare allele frequency $\geq 1\%$ in populations of European or Caucasian ethnicity. From 294 *EWS* SNPs, we preselected 20 and submitted them to TaqMan® SNP Genotyping Assays protocols

(<http://www.appliedbiosystems.com.br>). Finally, for this study we selected three as major candidate *EWS* SNPs: rs2301291 (intron 1, G>A), rs4820803 (intron 3, G>C) and rs4820804 (intron 3, T>C) (Figure 1).

***EWS* SNP Genotyping**

DNA was extracted from the blood cells of the subjects following the protocol of Lahiri and Nurnberger (1991). Genotyping was performed by TaqMan® assay for allelic discrimination using the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA., EUA; Life Technologies Corporation, USA) and analyzed using the allelic discrimination endpoint analysis mode of the Sequence Detection software package, SDS Version 1.3.1. We used a quality control system to ensure genotyping accuracy: sequencing verification of the DNA amplified fragment, negative controls, and repetitions.

Sequencing was performed in 10% of the samples for each SNP in order to ensure the reliability of the results obtained with the Real-Time PCR analysis. The primers used to amplify the targeted regions were design using the Primer3 algorithm (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) and are presented in Table 2. Amplification of samples was performed in a final volume of 25µl reaction containing 0.1-1ng of DNA in 1µL, 12,5µL of TaqMan Universal PCR MasterMix (Applied Biosystems, Foster, CA., EUA), 1µL of 10 pmol/µL forward and reverse primers and Milli-Q water. PCR was performed on the Veriti Thermal Cycler (Life Technologies Corporation, USA) using the following conditions: predenaturation at 95°C for 10 min, followed by 34 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 5 min. PCR products were purified using ethanol precipitation. Sequencing was conducted under BigDye™ terminator cycling conditions and performed using Automatic Sequencer ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster, CA., EUA; Life Technologies Corporation, USA).

Statistical analysis

Using Fisher's or Pearson's Chi-Square Test, we compared genotype and allele frequencies between groups, and tested the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Haplotypes were assembled using Phase software v 2.1.1 (Stephens et al. 2001; Stephens and Donnelly 2003) and Arlequin software v 3.5.x (Excoffier and Lischer 2010). For genotype comparisons between patients and control group, we tested the three genotypes independently and also using combinations with the rarest allele homozygote plus heterozygote *versus* the wild allele homozygote or the wild allele homozygote plus heterozygote *versus* the rarest allele homozygote. For an association study, we tested all possible haplotype constructions yet. Transmission Disequilibrium Test (TDT) was performed to determine if there was a presence of genetic linkage between allelic inheritance and Ewing's sarcoma. A p-value <0.05 was assumed as significant in all tests conducted.

RESULTS AND DISCUSSION

We genotyped three SNPs in introns 1 and 3 of *EWS* gene. All SNPs were in HWE for the control group ($p < 0.05$; Chi-Square Test). Allele and genotypic frequencies were calculated and compared with those obtained by three different projects (HAPMAP, PERLEGEN and SNP500CANCER). The results are presented in Table 3. Southern Brazilian population is already known to have European inheritance as well as a rarer African and Asian traits (Salzano and Freire-Maia 1970; Parra et al. 2003). Our control group was important as a representative population sample, which allowed us to know the frequencies of each allele in Southern Brazilian population. When analyzing the frequencies of other populations of different projects, we can notice how important it is to know the frequencies of your own population. Accordingly, the three SNPs genotypic and allelic frequencies were similar to Europeans from PERLEGEN or SNP500CANCER, and significant differences were found when Brazilian controls were also compared with Africans, Asians or Europeans from HAPMAP project. The variability between the populations could be explained, at least, due to geographic particularities of each

one of them (especially considering the founder effect), or because of the reduced sample size investigated (<1000 subjects). The particularities of each ethnic composition (the genetic background) of people could also be a factor to explain the differences or similarities among the populations.

To investigate if some SNP or SNP-arrangement could have different incidence in affected individuals, we performed association studies comparing genotypic frequencies of rs2301291, rs4820803, and rs4820804, and all possible genotype combinations between Ewing's Sarcoma patients and control group. Of the three SNPs investigated individually, only one of them showed a significant result when compared to the control group (Table 4). Our non-combined analysis revealed a higher presence of homozygote TT-rs4820804 in Ewing's Sarcoma patients. However, when conducting a grouped analysis with all genotypes of all three SNPs (possible SNP-arrangements inheritance and/or haplotype combinations) to analyze if a combined heritage could present some synergistic effect on the disease, we could not detect a more important significant result (all $p > 0.05$; Chi-Square Test).

In addition, to examine if some SNP, SNP-arrangement and/or haplotype combinations could have been preferentially inherited by affected individuals, we performed transmission disequilibrium tests comparing data from Ewing's Sarcoma patients and from their families (parents and siblings). Figure 2 shows this family study, but no statistically significant result was found (individually rs2301291: $p = 0.749$; rs4820803: $p = 0.759$; rs4820804: $p = 0.274$; Transmission Disequilibrium Test) even though this test is appropriate to this investigation (Cox et al. 1999).

Finally, here we find that the TT-rs4820804 *EWS* genotype was significantly higher in patients with Ewing's Sarcoma phenotype. Complex diseases like Ewing's Sarcoma are caused by many intrinsic (genetics) and extrinsic (ambiental) factors, and each factor alone has a little and particular effect.

To search for candidate genetic markers to understand a complex disease is like looking for a needle in a haystack. Our work has limitations because we only studied a single segment of the *EWS* gene, but it brought a very important result in the Ewing's Sarcoma scenario. Even if the effect of the TT-rs4820804 *EWS* genotype is small, it was strong enough to appear given the conditions of our work. Thus, this finding provides one more new information about the

effect of *EWS* gene SNPs and we could hypothesize that the T-rs4820804 variant in homozygosis applies a negative effect on tumor development. Since *EWS/FLI* is a key translocation in Ewing's sarcoma, it is plausible to suggest the rs4820804 SNP as a candidate to understand the *EWS* breakage susceptibility, even though it is a common and non functional polymorphic variation.

Translocations occur in many cancers and a malfunction gene can be created by the fusion of portions of two different genes. However, little is known about why or where chromosomes break. Blitzblau et al (2007) mapped meiotic DSBs (double-strand breaks) in budding yeast and showed that DSBs do not appear randomly, but occur most frequently in a specific band near telomeres and at high rates around the centromere. According to Gao et al. (2005), genetic studies in yeast have revealed that the breaking hotspots contain special sites for recombination initiation and result in heterogeneous distribution of recombination (along the chromosome length or across the genome). In humans, more knowledge concerning the hotspots for chromosome breaking could help better understand some aspects of cancer. We believe that the presence of a particular SNP or the combination of different SNPs in a certain sequence can make a region fragile and prone to chromosome break.

In conclusion, the present study provides evidence statistically founded that the TT-rs4820804 *EWS* genotype can associated with Ewing's sarcoma. Moreover, this polymorphism can be clinically useful as a potential genetic marker to the prognostic of risk to develop this cancer or to provide insights into *EWS* chromosome breakage context of tumorigenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FAPERGS and Instituto do Câncer Infantil do Rio Grande do Sul. Deborah Soares Bispo Santos Silva, Fernanda Rosa Sawitzki, Juliane Bentes Picanço and Pietra Graebin are supported by CAPES. We would also like to thank Dr. Diógenes S. Santos, Dr. Luiz Augusto Basso and Ana Cristina de O. Dias.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

- Blitzblau HG, Bell GW, Rodriguez J, Bell SP, Hochwagen A (2007) Mapping of meiotic single-stranded DNA reveals double-stranded-break hotspots near centromeres and telomeres. *Curr Biol* 17(23):2003-2012
- Burchill SA (2003) Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J Clin Pathol* 56:96–102
- Cox A, Camp NJ, Cannings C, di Giovine FS, Dale M, Worthington J, John S, Ollier WE, Silman AJ, Duff GW (1999) Combined sib-TDT and TDT provide evidence for linkage of the interleukin-1 gene cluster to erosive rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 8(9):1707-1713
- Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M et al (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359:162–165
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564-567
- Fidelia-Lambert MN, Zhuang Z, Tsokos M (1999) Sensitive Detection of Rare Ewing's Sarcoma Cells in Peripheral Blood by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction. *Hum Pathol* 30(1):78-80
- Gao L, Mu XQ, Lin Y, Li YG, Cheng ZK (2005) Meiotic recombination hotspots in eukaryotes. *Yi Chuan* 27(4):641-650
- Grier HE (1997) The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr Clin North Am* 44:991–1104
- Huvos AG (1991) Ewing's sarcoma. In: *Bone tumors: diagnosis, treatment and prognosis*, 2nd edn. Sanders, Philadelphia, pp 523–552
- Jedlicka P (2010) Ewing sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions. *Int J Clin Exp Pathol* 3(4):338-347

- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19(19):5444
- Ludwig JA (2008) Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Curr Opin Oncol* 20(4):412-418
- Ozaki T, Schaefer KL, Wai D, Yokoyama R, Ahrens S, Diallo R et al (2002) Population-based genetic alterations in Ewing's tumors from Japanese and European Caucasian patients. *Ann Onco* 13:1656-1664
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD (2003) Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:177-182
- Randall RL, Lessnick SL, Jones KB, Gouw LG, Cummings JE, Cannon-Albright L, Schiffman JD (2010) Is there a predisposition gene for Ewing's Sarcoma? *J Oncol* 2010:1-6
- Rerin JS (2000) Analysis of Ewing tumors by Comparative Genomic Hybridization (CGH). University of Westfälische Wilhelms
- Salzano FM, Freire-Maia N (1970) Problems in human biology. A study of Brazilian populations. Wayne State University Press, Detroit
- Sorensen PH, Liu XF, Delattre O, Rowland JM, Biggs CA, Thomas G, Triche TJ (1993) Reverse transcriptase PCR amplification of *EWS/FLI-1* fusion transcripts as a diagnostic test for peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Diagn Mol Pathol* 2:147-157
- Stephens M, Smith N, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978-989
- Stephens M, Donnelly P (2003) A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73(5):1162-1169
- Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M et al (1993) Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing's family of tumours. *EMBO J*. 12:4481-4487
- Zucman-Rossi J, Batzer MA, Stoneking M, Delattre O, Thomas G (1997) Interethnic polymorphism of EWS intron 6: genome plasticity mediated by Alu retroposition and recombination. *Hum Genet* 99:357-363

TABLES

Table 1. Analysis performed to confirm the clinical diagnosis (A), and sites affected by Ewing sarcoma (B) in 24 patients.

A- ANALYSIS FOR DIAGNOSIS	Patients [N (%)]
X-ray	24 (100)
Exploratory surgeries	5 (20.8)
Muscular cell biopsy (histological/immunohistochemical analysis)	1 (4.2)
Tumor cell biopsy (histological/immunohistochemical analysis)	24 (100)
Bone marrow cell biopsy (histological/immunohistochemical analysis)	24 (100)
CSF cell biopsy (histological/immunohistochemical analysis) from LP*	3 (12.5)
B- AFFECTED BONES	Patients [N (%)]
Lower extremities (7 Femur; 1 Fibula; 2 Tibullus)	11 (45.8)
Pelvis	4 (16.7)
Upper extremities (2 Humerus)	2 (8.3)
Axial skeleton and ribs (1 Cervical spine; 4 Chest)	5 (20.8)
Face (2 Jaw)	2 (8.3)

*Lumbar puncture (LP) was the procedure performed to collect a sample of cerebrospinal fluid (CSF) for analysis.

Table 2. Primer sequences used to amplify the targeted regions of single nucleotide polymorphisms (SNPs) designing by Primer3 algorithm (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) and polymerase chain reaction data.

SNP	Primer Sequence (5'-3')	Annealing Temperature	Product Length
rs2301291	Forward: CGGGTGAGTATGGTGGAACT Reverse: GGGGAGGGGAGAGGAATG	60°C	176 bp
rs4820803	Forward: TGAGTGAACCAGATAAGGGATAAC Reverse: CCATATGCCTGCTCCAAAAA	60°C	198 bp
rs4820804	Forward: TGTTTTTGATTTTGGTTCTCCA Reverse: CCCATAGGTTGCAGTGGTCT	60°C	179 bp

Table 3. Allelic and genotypic frequencies of rs2301291, rs4820803, and rs4820804 SNPs in control subjects from South Brazilian sample and their comparison with data from three populations investigated by HAPMAP, PERLEGEN and SNP500CANCER Projects.

	HAPMAP ¹				PERLEGEN ² or SNP500CANCER ³		
	Controls	European	African	Asian ⁴	European	African ⁵	Asian ⁶
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
rs2301291	N=206	N=226	N=226	N=258	N=46	N=46	N=48
AA	17 (8.3)	34 (15)	18 (8)	106 (41)	2 (4.3)	6 (13)	28 (58.3)
AG	85 (41.3)	116 (51.3)	86 (38)	124 (48)	22 (47.8)	18 (39.1)	16 (33.3)
GG	104 (50.4)	76 (33.6)	122 (54)	28 (11)	22 (47.8)	22 (47.8)	4 (8.3)
P		<0.001	0.7621	<0.001	0.5501	0.5943	<0.001
A	119 (29)	184 (40.7)	122 (27)	336 (65.1)	26 (28.3)	30 (32.6)	69 (75.0)
G	293 (71)	268 (59.3)	330 (73)	180 (34.8)	66 (71.7)	62 (67.4)	23 (25.0)
P		<0.001	0.5356	<0.001	0.9050	0.4789	<0.001
rs4820803	N=202	N=226	N= 226	N= 258	N= 46	N= 46	N= 48
CC	2 (1)	6 (2.7)	19 (8.5)	16 (6.2)	0 (0)	2 (4.3)	4 (8.3)
CG	64 (31.7)	70 (31)	64 (28.4)	114 (44.2)	16 (34.8)	16 (34.8)	16 (33.3)
GG	136 (67.3)	150 (66.3)	143 (63.1)	128 (49.6)	30 (65.2)	28 (60.9)	28 (58.3)
P		0.4463	<0.001	<0.001	0.7438	0.0353	0.0099
C	68 (16.8)	82 (18.1)	90 (19.9)	146 (28.3)	16 (17.4)	20 (21.7)	24 (25.0)
G	336 (83.2)	370 (81.9)	362 (80.1)	370 (71.7)	76 (82.6)	72 (78.3)	72 (75.0)
P		0.6147	<0.001	<0.001	0.8972	0.2661	<0.001
rs4820804	N=208	N=226	N=226	N=258	N= 62	N= 48	N= 48
CC	34 (16.3)	18 (8)	16 (7.1)	16 (6.2)	8 (0.13)	4 (0.08)	10 (0.21)
CT	110 (52.9)	104 (46)	60 (26.5)	114 (44.2)	34 (0.55)	10 (0.21)	12 (0.25)
TT	64 (30.8)	104 (46)	150 (66.4)	128 (49.6)	20 (0.32)	34 (0.71)	26 (0.54)
P		<0.001	<0.001	<0.001	0.8056	<0.001	<0.001
C	178 (42.8)	140 (31)	92 (20.4)	146 (28.3)	50 (0.40)	18 (0.19)	32 (0.33)
T	238 (57.2)	312 (69)	360 (79.6)	370 (71.7)	74 (0.59)	78 (0.81)	64 (0.67)
P		<0.001	<0.001	<0.001	0.6255	<0.001	0.0895

¹Submitter Population Handle / ID: CSHL-HAPMAP / HapMap; ²Submitter Population Handle / ID: PERLEGEN / AFD_EUR_PANEL; ³Submitter Population Handle / ID: SNP500CANCER. ⁴We considered both Asian populations HapMap-HCB (N=86) and HapMap-JPT (N=172) together. ⁵African American in PERLEGEN project. ⁶PACIFIC RIM heritage in SNP500CANCER project. All comparisons were made between Control *versus* each HAPMAP, PERLEGEN and

SNP500CANCER populations by Pearson's Chi-Square Test. (For more information about HAPMAP, PERLEGEN and SNP500CANCER samples, please visit: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2301291, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4820803; and http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4820804).

Table 4. Genotype frequencies of rs2301291, rs4820803, and rs4820804 SNPs in patients with Ewing sarcoma *versus* control group.

SNP	Genotype	Controls	Patients	P value
		N (%)	N (%)	
rs2301291	AA+AG	102 (49.5)	12 (50.0)	0.86
	GG	104 (50.5)	12 (50.0)	
rs2301291	AG+GG	189 (91.7)	20 (83.3)	0.36
	AA	17 (8.3)	4 (16.7)	
rs4820803	CC+CG	66 (32.7)	9 (37.5)	0.81
	GG	136 (67.3)	15 (62.5)	
rs4820803	CG+GG	200 (99.0)	24 (100.0)	0.56
	CC	2 (1.0)	0 (0.0)	
rs4820804	CC+CT	144 (69.2)	10 (41.7)	0.02*
	TT	64 (30.8)	14 (58.3)	
rs4820804	CT+TT	174 (83.7)	18 (75.0)	0.45
	CC	34 (16.3)	6 (25.0)	

* p<0.05.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Selected *EWS* SNPs. NCBI Assembly Location: Chromosome 22 on NCBI Build 37; Gene: *EWSR1* (5' - 3'); Gene structure: exons and introns; Arrows: location of SNPs rs2301291 (1), rs4820803 (2) and rs4820804 (3). Identified using Alignment Map. Available in: <https://www.appliedbiosystems.com>.

Figure 2. Genotypes of 3 SNPs of patients with Ewing's sarcoma and their relatives. We studied the pedigree of 23 families; one patients' family members had not DNA to genotyping.

FIGURE 1

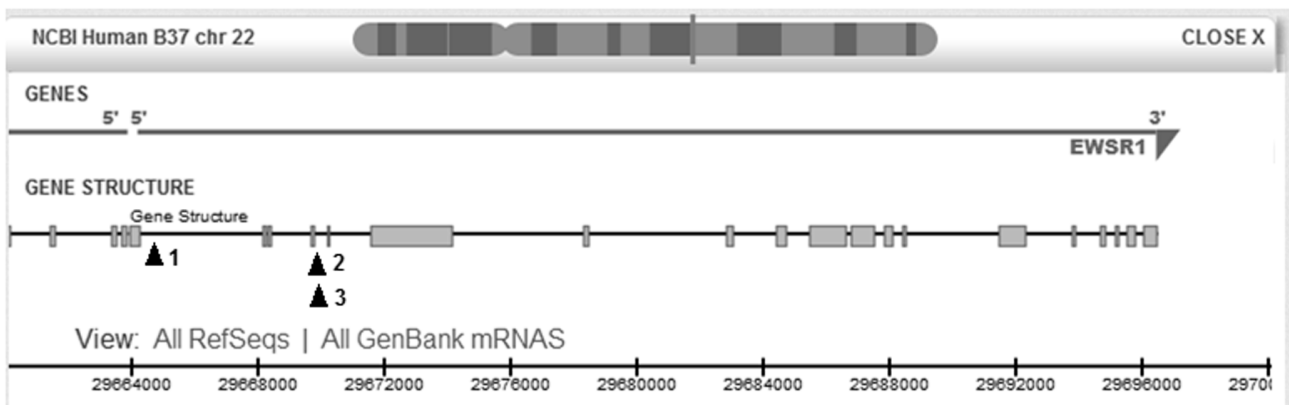
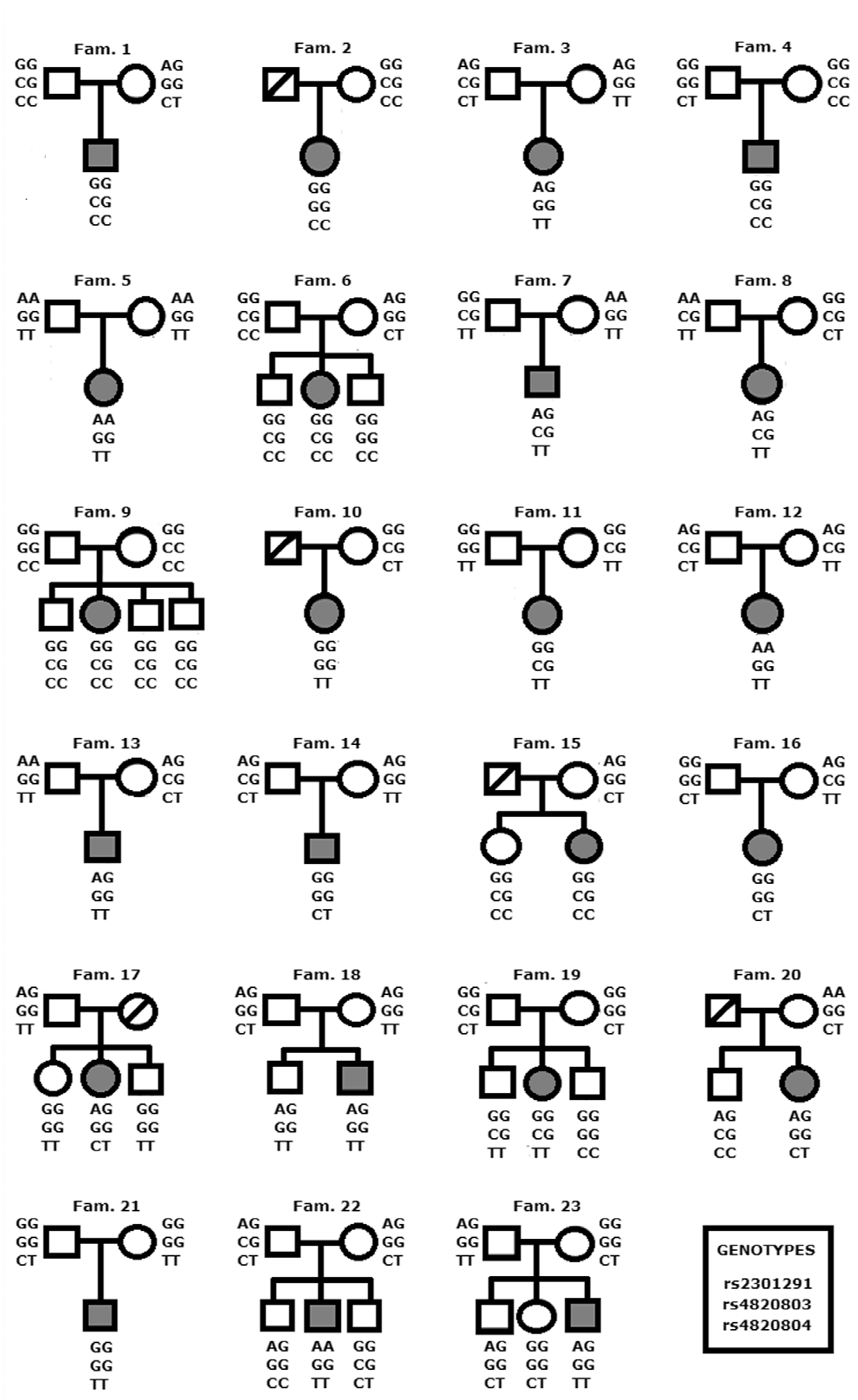


FIGURE 2



CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

No Sarcoma de Ewing é recorrente a quebra e a translocação cromossômica. Dentre os genes envolvidos nesta translocação está o gene *EWS*, localizado no cromossomo 22. Entretanto, pouco se sabe a respeito da região de quebra deste gene e quais sequências poderiam levar a uma maior susceptibilidade a quebra cromossômica.

Neste trabalho, analisamos SNPs localizados dentro da região de quebra do gene *EWS*. Comparamos as frequências alélicas e genótípicas entre as populações deste estudo e entre populações de projetos já publicados no *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI). Através dessas comparações foi possível notar as diferenças e/ou similaridades entre as populações e isso mostrou como é importante conhecer as frequências da nossa população. Procuramos também analisar se algum SNP ou se alguma combinação específica desses SNPs poderia influenciar na incidência ou na herança preferencial do Sarcoma de Ewing. Nossos resultados mostraram uma maior incidência no genótipo TT-rs4820804 nos pacientes, o que demonstra que este genótipo pode estar associado ao Sarcoma de Ewing e que este polimorfismo possa ser um marcador genético em potencial para esta doença ou que possa ser um fator importante no entendimento da quebra cromossômica que ocorre no gene *EWS*.

Pouco se sabe sobre o Sarcoma de Ewing e o seu desenvolvimento, sendo então importante a investigação dos diferentes genes associados a esta doença. Para ampliar este estudo, também estão sendo analisados SNPs no gene *FLI1*, que faz parte da translocação junto com o gene *EWS*, assim como análises de regiões repetitivas (GGAA) no gene *NROB1*, onde se liga o produto quimérico *EWS/FLI1*. A proliferação celular em um indivíduo afetado pode ocorrer não apenas pelo padrão de herança presente em um gene e sim devido a um efeito cumulativo de diferentes fatores em diferentes genes. Dessa maneira, a alteração celular se estabelece e inicia-se a proliferação. Isso significa que para conhecer a susceptibilidade de um indivíduo a um câncer como o Sarcoma de Ewing, não basta apenas conhecer padrões presentes no gene *EWS*, mas também deve-se estudar as estruturas gênicas presentes em, pelo menos, outros genes como *NB0R1* e *FLI1*.

Acredita-se que a análise conjunta de todos os estudos envolvendo o Sarcoma de Ewing possa ajudar a melhor compreender este câncer e os mecanismos que levam a sua formação e o seu desenvolvimento. O câncer sofre a interferência de múltiplos fatores. Diversos fatores externos e de fatores intrínsecos podem determinar simultaneamente a susceptibilidade de um indivíduo a essa doença complexa. Cada efeito externo e cada um dos genes herdados exercerão isoladamente um pequeno efeito, mas que cumulativamente definirá o desfecho da proliferação celular. O descontrole celular que leva ao tumor está, portanto, muito relacionado à herança genética que o indivíduo recebeu. Recentemente tem sido relacionada à presença de padrões no promotor do gene *EWS* a uma resposta anormal celular. Considerando que a literatura experimental tem reportado que variantes no *EWS* podem levar ao desenvolvimento de hipoplasia, é possível sustentar a possibilidade de que determinadas estruturas nesse gene possam influenciar o risco de um indivíduo. Apesar destes resultados, acredita-se estar longe a obtenção de uma resposta concreta sobre quais os reais fatores que desencadeiam à susceptibilidade ao sarcoma. Há ainda muito que se descobrir sobre o câncer e de como o organismo humano responde aos diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos, e por que algumas pessoas tendem a ter o mesmo desfecho clínico, mesmo não sendo encontrada associação estatística com os principais sinalizadores do câncer. Trabalhar com esta variante polimórfica do gene *EWS* foi um empenho a mais na busca de desvendar parte do pequeno efeito que a herança genética pode ter sobre a tumorigênese.

Com base nos objetivos deste trabalho, concluiu-se que:

1- Entre os SNPs presentes no gene *EWS* mais informativos, segundo a frequência dos alelos nas populações e o seu efeito fenotípico, estão rs2301291, rs4820803 e rs4820804.

2- Foi gerada e estabelecida com êxito a genotipagem dos SNPs selecionados e executada nas amostras de DNA provenientes de pacientes afetados pelo Sarcoma de Ewing, nos indivíduos aparentados ao afetado (pai, mãe e irmãos), bem como em amostras de DNA proveniente de indivíduos não afetados pelo Sarcoma de Ewing (população controle).

3- As frequências genotípicas e alélicas dos SNPs do gene *EWS* no grupo de afetados e na população controle estiveram dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg e foram: Afetados - rs2301291: AA=16.7; AG=33.3; GG=50.0; A=33.3; G=66.7, rs4820803: CC=0.0; CG=37.5; GG=62.5; C=18.75; G=81.25, rs4820804: CC=25.0; CT=16.7; TT=58.3; C=33.3; T=66.7. Controles - rs2301291: AA=8.3; AG=41.3; GG=50.4; A=29.0; G=71.0, rs4820803: CC=1.0; CG=31.7; GG=67.3; C=16.8; G=83.2, rs4820804: CC=16.3; CT=52.9; TT=30.8; C=42.8; T=57.2.

4- Ao comparar as frequências genotípicas, alélicas e haplotípicas entre os grupos de indivíduos afetados e controles foi verificado que apenas uma diferença foi estatisticamente significativa: o genótipo TT-rs4820804 mostrou-se com maior incidência entre os pacientes.

5- A análise de segregação de alelos e haplótipos entre geração parental e filial afetada mostrou ausência de desequilíbrio de transmissão entre as gerações.

ANEXO - CEP-PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-670/11

Porto Alegre, 19 de abril de 2011.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05424 intitulado **"Haplótipos de diferentes SNPs no interior do gene EWS em indivíduos afetados e não-afetados pelo sarcoma de Ewing"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Clarice Sampaio Alho
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar – CEP: 90610-000
Sala 314 – Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep