

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

ELISA CRISTINA DE TONI

**MICROSSATÉLITES (GGAA)_n NO PROMOTOR DO GENE NROB1 EM PACIENTES
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 BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**MICROSSATÉLITES (GGAA)_n NO PROMOTOR DO GENE NROB1 EM PACIENTES
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: ELISA CRISTINA DE TONI

Orientadora: Dra. CLARICE SAMPAIO ALHO

Porto Alegre

2012

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Antonio Telmo e Solange e a minha irmã Ana Rosa por sempre acreditarem no meu potencial e serem meus maiores exemplos de dedicação, superação e caráter. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Dra. Clarice Sampaio Alho, por ter confiado em mim, pela maravilhosa convivência ao longo do desenvolvimento deste trabalho, pelas infinitas conversas e conselhos.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Genética Humana e Molecular em especial, Déborah Soares Bispo Santos Silva, Fernanda Sawitzki, Juliane Bentes Picanço, Aline Ponzoni e Pietra Graebin pela companhia, carinho, amizade e convivência junto a vocês nestes longos tempos de Mestrado.

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

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO 1- APRESENTAÇÃO DO TEMA	8
1. Sarcoma de Ewing	8
2. Causas moleculares	9
3. Tipo de herança e predisposição ao sarcoma de Ewing	11
4. Gene EWS	12
5. Gene NR0B1	13
6. ETS e EWS/FLI1 no sarcoma de Ewing	15
7. Objetivos	16
8. Bibliografia	16
CAPÍTULO 2- ARTIGO CIENTÍFICO	20
CAPÍTULO 3– CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
ANEXO CEP-PUCRS	30

RESUMO

O sarcoma de Ewing é um tumor altamente agressivo que afeta ossos e tecidos moles. Ele acomete principalmente crianças e adultos jovens. 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). A translocação mais frequente envolve os genes EWS e FLI1. Esta translocação leva à formação do fator de transcrição quimérico aberrante EWS/FLI1. O fator EWS/FLI1 regula o promotor do gene NROB1 através de uma ligação direta a sequências de microssatélites GGAA. Nosso objetivo foi identificar e descrever a estrutura molecular de motivos GGAA no promotor de NROB1 em pacientes com Sarcoma de Ewing não relacionados e não afetados da população sul brasileira. Foram identificados 21 alelos diferentes em 224 indivíduos estudados. Todos os alelos tiveram, pelo menos, de 4 a 5 motivos consecutivos GGAA. O alelo 24.2, correspondente a sequência $(GGAA)_7A(GGAA)_7A(GGAA)_{10}$, foi o mais freqüente em nossa população, estando presente em 50,4% de todos os indivíduos. O alelo 24.2 pode estar associado ao desenvolvimento do Sarcoma de Ewing, dado que sua frequência foi significativamente mais alta entre afetados. Diferenças na configuração global dos microssatélites GGAA no promotor de NROB1 (em relação à tamanho, sequência, quantidade e posição das repetições GGAA e inserções de base única 'A') podem resultar em diferente susceptibilidade ao sarcoma de Ewing. Tais resultados poderão fornecer subsídios para uma melhor compreensão da tumorigênese.

ABSTRACT

Ewing's sarcoma is a highly aggressive tumor of bone and soft tissues. It affects mainly children and young adults. In about 88% to 95% there is the occurrence of a translocation between the EWS gene (22q12 locus) and two members of ETS transcription factors family: FLI1 (11q24 locus) or ERG (21q22). The most common translocation involves gene EWS and FLI1. This translocation leads to the formation of EWS/FLI1 chimeric aberrant transcription factor. The EWS/FLI1 regulates the *NROB1* gene promoter through a direct binding to GGAA microsatellites sequences. Our objective was to identify and describe the molecular structure of GGAA motifs in *NROB1* promoter in unrelated Ewing's Sarcoma patients and healthy subjects from South Brazilian population. Were identified 21 different alleles in the 224 subjects. All alleles had at least 4 to 5 consecutive GGAA motifs. The 24.2, corresponding to (GGAA)₇A(GGAA)₇A(GGAA)₁₀ sequence, was the most frequent in our population, being present in 50.4% of subjects. Allele 24.2 could be associated to Ewing's sarcoma development since it was significantly more frequent among patients. Differences in the global configuration of *NROB1* promoter GGAA microsatellites (size, sequence, amount and position of GGAA repeats and single 'A' base insertions) could result in differences in Ewing's sarcoma susceptibility. These results would provide insights for the understanding of tumorigenesis.

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 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: julho de 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 raças (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. Entretanto, 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 grande ajuda para um diagnóstico preciso.

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 frequente envolve os genes EWS e FLI1, a qual ocorre em aproximadamente 85% dos casos, seguidas pela translocação do EWS com o gene ERG, a qual ocorre em cerca de 5-10% dos casos (Figura 1) (Delattre *et al.*, 1992; Sorensen *et al.*, 1993; Zucman *et al.*, 1993; Ozaki *et al.*, 2002).

Table 1 EWS fusion types described in Ewing's sarcoma family of tumours (ESFT) and other sarcomas

Translocation	Gene fusion	Tumour type (% of tumours with this EWS gene rearrangement)
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)
t(12;22)(q13;q12)	EWS-AFT1	<i>Clear cell sarcoma</i>
t(11;22)(q13;q12)	EWS-WT1	<i>Desmoplastic small round cell tumour</i>
t(9;22)(q22;q12)	EWS-CHN	<i>Myxoid chondrosarcoma</i>
t(12;22)(q13;q12)	EWS-CHOP	<i>Myxoid liposarcoma</i>

The presence of EWS-ETS gene rearrangements is increasingly used to define ESFT. The involvement of the EWS gene on chromosome 22q is consistent; this can partner with several different ETS gene family members located on various chromosomes, but most frequently with FLI1 on chromosome 11 in ESFT. Rearrangements of the EWS gene on chromosome 22q12 with other chromosomes have also been described in other less common sarcoma types (shown in italics).

Figura 1: Tabela retirada do artigo de Burchill (2003) que mostra as diferentes translocações cromossômicas envolvendo o gene EWS.

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 (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 transcricional aumentada quando comparado ao normal FLI1 (Burchill, 2003; Gangwal *et al.*, 2008).

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.

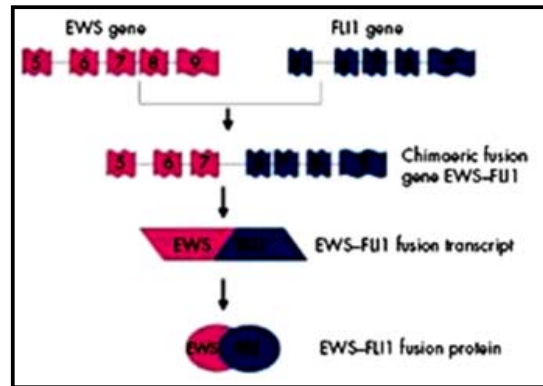


Figura 2: Representação da forma mais comum dos locais de quebra e fusão dos genes EWS e FLI1 (gravura reproduzida da publicada por Burchill, 2003).

Na família dos tumores do 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).

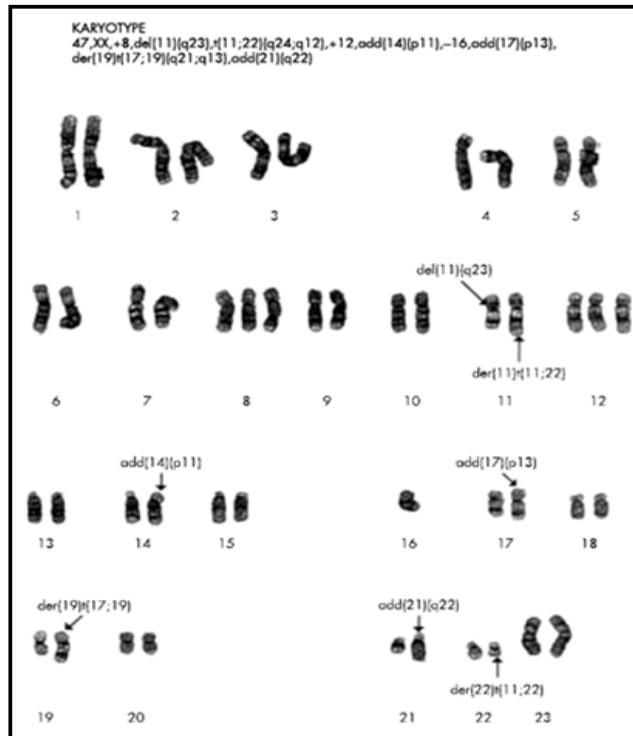


Figura 3: Variantes de anormalidades cromossômicas encontradas em pacientes portadores de sarcoma de Ewing (Burchill, 2003).

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 à 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*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=EWS+homo+sapiens>. Acesso em: maio de 2010).

O gene EWS tem cerca de 33 kb de DNA 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 (Figura 4) (EWSR1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2130>. Acesso em: maio de 2010).

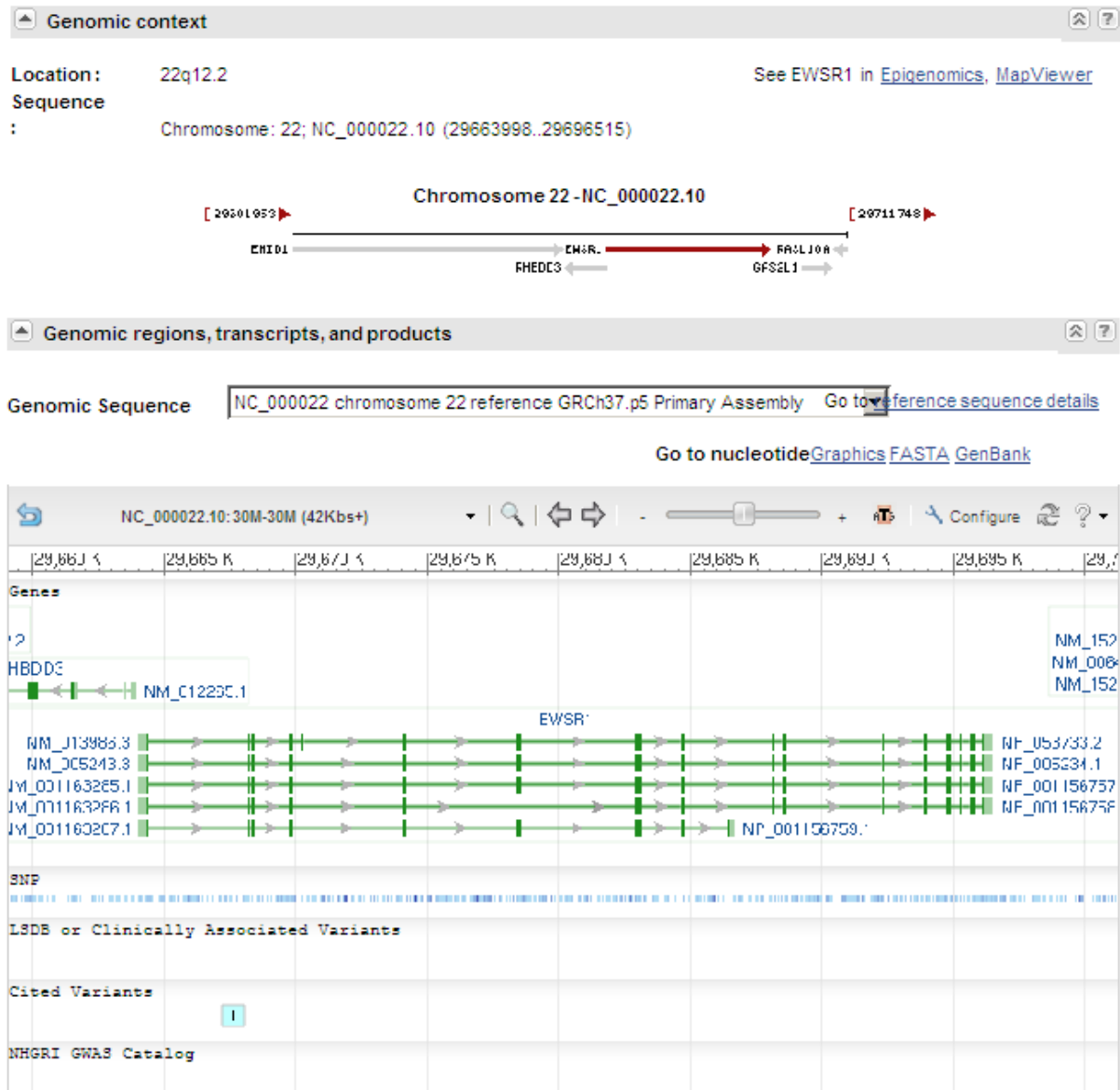


Figura 4: Representação do gene EWS e suas variantes transcritas (A) e do seu contexto genômico (B) (EWSR1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2130>. Acesso em: março de 2012).

5- Gene NROB1

Esse gene tem como símbolo oficial NROB1 (Nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1 - *Homo sapiens*) e está localizado no cromossomo X na banda citogenética 21.3 (GeneID 190) (Figura 5) (NROB1 *Homo sapiens*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NROB1+homo+sapiens>. Acesso em: agosto de 2010).

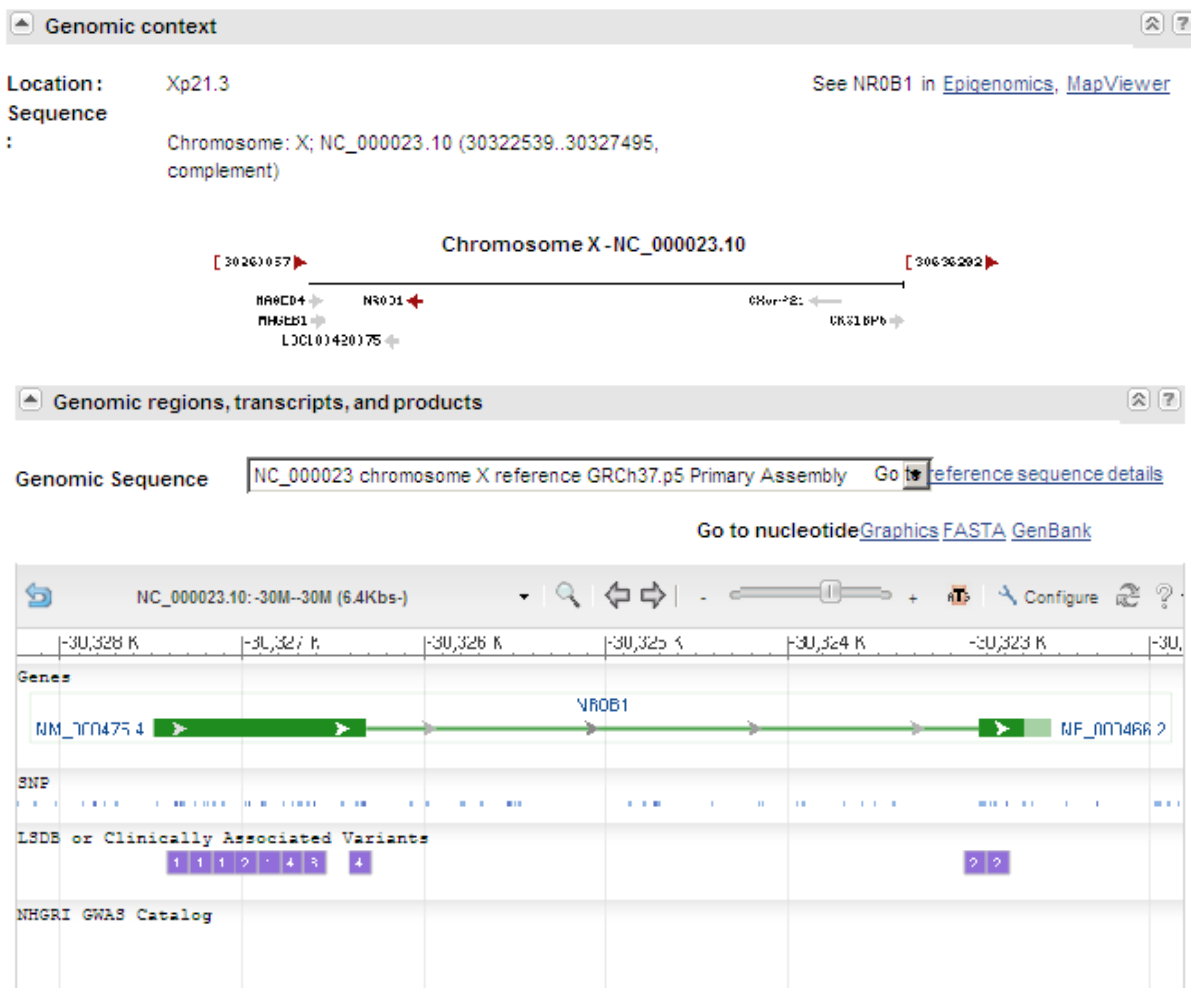


Figura 5: Representação do gene NROB1 e suas variantes transcritas (A) e do seu contexto genômico (B) (NROB1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/190>. Acesso em: março de 2012).

O gene NROB1 (lôcus Xp21.3) tem aproximadamente 5 kb de DNA e dois exons. Esse gene codifica uma proteína que possui um domínio de ligação ao DNA. A proteína codificada age como um domínio regulador negativo da transcrição. Esta proteína também funciona como um fator anti-testis, agindo antagonicamente ao gene SR-Y. Mutações no NROB1 podem levar ao desenvolvimento de hipoplasia congênita adrenal ligada ao X juntamente com hipogonadismo hipogonadotrófico. O NROB1 possui sequências de microssatélites (GGAA)n aonde se liga o fator de transcrição quimérico aberrante produzido pelo gene EWS/FLI1. O número de sequências microssatélites parece influenciar na afinidade de ligação deste fator e, conseqüentemente, afetar o desenvolvimento do sarcoma de Ewing (Kinsey *et al.*, 2006).

6- ETS e EWS/FLI1 no sarcoma de Ewing

As proteínas ETS são extremamente importantes no desenvolvimento de tumores humanos (Numm *et al.*, 1983; De Taisne *et al.*, 1984). Muitos membros da família dos ETS se ligam a sequências de DNA contendo motivos principais GGAA (ou GGAT em alguns casos). Sequências que flanqueiam o núcleo GGAA contribuem com a afinidade e especificidade das interações (Seth & Watson, 2005; Sharrocks, 2001; Szymczyna & Arrowsmith, 2000).

O tumor de Ewing foi o primeiro tumor no qual se demonstrou que os membros da família ETS estavam envolvidos em translocações cromossômicas, sendo assim, serviu de paradigma para cânceres guiados por ETS (Guillon, 2009). Como já mencionado, na maioria dos casos do sarcoma de Ewing, essa translocação ocorre entre os cromossomos 11 e 22, levando a formação do fator de transcrição quimérico aberrante EWS/FLI1 (Delattre *et al.*, 1992; Guillon *et al.*, 2009). Vários procedimentos experimentais têm demonstrado que os fatores ETS se ligam a sequências ricas em purinas com núcleo GGAA/T (Mao *et al.*, 1994; Ray-Gallet *et al.*, 1995; Shore & Sharrocks, 1995; Szymczyna & Arrowsmith, 2000), de forma que, atualmente, é amplamente aceito que o potencial oncogênico do EWS/FLI1 é, no mínimo, parcialmente mediado pela modulação da expressão de alvos transcricionais (Janknecht, 2005).

O EWS/FLI1 desempenha um papel crítico no estabelecimento e na manutenção do fenótipo tumorigênico nas células portadoras do sarcoma de Ewing (Kinsey *et al.*, 2006; Smith, *et al.*, 2006; Ouchida *et al.*, 1995; Owen & Lessnick, 2006; Prieur *et al.*, 2004). Segundo Guillon *et al.* (2009), o EWS/FLI1 usa os microssatélites que contêm a sequência GGAA para regular alguns de seus genes alvo, incluindo seu alvo oncogenético chave, o gene NR0B1. De fato, o EWS/FLI1 regula o promotor do gene NR0B1 através de uma ligação direta com a sequência de microssatélites GGAA (Garcia-Aragoncillo *et al.* 2008; Gangwall *et al.* 2008). De forma interessante, a correlação foi observada entre o número de blocos de repetição GGAA e o nível de expressão do NR0B1, reforçando a hipótese de que vários monômeros de EWS/FLI1 podem estar cooperando com uma região rica em GGAA (Garcia-Aragoncillo *et al.* 2008).

De acordo com Guillon *et al.* (2009), a ligação *in vivo* do EWS/FLI1 às sequências repetidas de GGAA demonstra uma preferência de ligação por regiões de nove ou mais repetições, e tais resultados apontam à grande contribuição dos elementos microssatélites GGAA a regulação dos genes alvo pelo EWS/FLI1. Não obstante, recentes estudos demonstram um novo papel para os microssatélites no câncer humano e sugerem um mecanismo exclusivo para a regulação dos fatores de transcrição ETS de genes alvo (Gangwall *et al.* 2008, Guillon *et al.* 2009 e Garcia-Aragoncillo *et al.* 2008).

7- Objetivos

O objetivo deste estudo foi analisar as sequências de microssatélites (GGAA)_n presentes no promotor do gene NROB1 em indivíduos afetados e não-afetados pelo sarcoma de Ewing. Especificamente, foram as intenções:

1. Identificar o número de repetições microssatélites (GGAA)_n presentes na sequência do promotor do gene NROB1 em indivíduos afetados pelo sarcoma de Ewing em indivíduos não-afetados pelo sarcoma de Ewing pertencentes à população do Rio Grande do Sul.
2. Criar a escada alélica de repetições microssatélites (GGAA)_n presentes na sequência do promotor do gene NROB1 na população estudada.
3. Comparar as frequências alélicas entre o grupo de indivíduos afetados pelo sarcoma de Ewing e o grupo de indivíduos não-afetados não aparentados.

8- Referências

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.

Burchill SA. Ewing's sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities. *J Clin Pathol*. 2003; 56: 96–102.

Delattre O, et al. (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumors. *Nature* 359:162-165.

De Taisne C, Gegonne A, Stehelin D, Bernheim A, Berger R (1984) Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-ets. *Nature* 310:581-583.

EWSR1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2130>. Acesso em: maio de 2010.

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, et al. (2008) Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10149-10154.

Garcia-Aragoncillo E, Carrillo J, Lalli E, Agra N, Gomez-Lopez G, et al. (2008) DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cell. *Oncogene*.

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.

Guillon N, Tirode F, Boeva V, Zynovyev A, Barillot E, Delatree O (2009) The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. *PLoS One* 4:(3) e493.

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

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.

Janknecht R (2005) EWS-ETS oncoproteins: the linchpins of Ewing tumors. *Gene* 363:1-14.

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, Lessnick SL (2006) NR0B1 is required for the oncogenic phenotype mediated by EWS/FLI in Ewing's Sarcoma. *Mol Cancer Res* 4:851-859.

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.

Mao X, Miesfeldt S, Yang H, Leiden JM, Thompson CB (1994) The FLI-1 and chimeric EWS-FLI-1 oncoproteins display similar DNA binding specificities. *J Biol Chem* 269:18216-18222.

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.

NROB1. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/190>. Acesso em: agosto de 2010.

NROB1 *Homo sapiens.* Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=NROB1+homo+sapiens>. Acesso em: agosto de 2010.

Numm MF, Seeburg PH, Moscovici C, Duesberg PH (1983) Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306:391-395.

Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, Reddy ES (1995) Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 11:1049-1054.

Owen LA, Lessnick SL (2006) Identification of target genes in their native cellular context: An analysis of EWS/FLI in Ewing's sarcoma. *Cell Cycle* 5:2049-2053.

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.

Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J. International variations in the incidence of childhood bone tumors. *Int J Cancer.* 1993; 53: 371-76.

Prieur A, Tirode F, Cohen P, Dellatre O (2004) EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 24:7275-7283.

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.

Ray-Gallet D, Mao C, Tavitian A, Moreau-Gachelin F (1995) DNA binding specificities of Spi-1/PU.1 and Spi-B transcription factors and identification of a Spi-1/Spi-B binding site in the c-fes/c-fps promoter. *Oncogene* 11:303-313.

Rerin JS. Analysis of Ewing tumors by Comparative Genomic Hybridization (CGH). Münster: Universidade Westfälische Wilhelms – Faculdade de Medicina; 2000.

Seth A, Watson DK (2005) ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 41:2462-2478.

Sharrocks AD (2001) The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:827-837.

Shore P, Sharrocks AD (1995) The ETS-domain transcription factors Elk-1 and SAP-1 exhibit differential DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res* 23:4698-4706.

Smith R, et al. (2006) Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 9:405-416.

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.

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.

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.

Szymczyzna BR, Arrowsmith CH (2000) DNA binding specificity studies of four ETS proteins support an indirect read-out mechanism of protein-DNA recognition. *J Biol Chem* 275:28363-28370.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO

(Manuscrito submetido ao periódico "HUMAN PATHOLOGY")

MANUSCRIPT TITLE: GGAA MICROSATELLITES IN NR0B1 PROMOTER: ALLELE (GGAA)₇A(GGAA)₇A(GGAA)₁₀ ASSOCIATED WITH EWING'S SARCOMA

AUTHORS, AFFILIATIONS AND ADDRESSES:

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

Deborah S. B. S. Silva: 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.

Pietra Graebin: 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.

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

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.

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

GGAA MICROSATELLITES IN *NROB1* PROMOTER: ALLELE (GGAA)₇A(GGAA)₇A(GGAA)₁₀ ASSOCIATED WITH EWING'S SARCOMA

ABSTRACT

Ewing's sarcoma is a very aggressive tumor of bone and soft tissues that occurs mainly during childhood and early adulthood is caused by a recurrent chromosomal translocation that encodes EWS/FLI oncoprotein. EWS/FLI binds to GGAA microsatellites, located in the promoter of *NROB1* gene. Our objective was to identify and describe the molecular structure of GGAA motifs in *NROB1* promoter in unrelated Ewing's Sarcoma patients and healthy subjects from South Brazilian population. A total of 21 different alleles were identified in the 224 subjects. All alleles had at least 4 to 5 consecutive GGAA motifs. The 24.2 *NROB1* promoter allele [(GGAA)₇A(GGAA)₇A(GGAA)₁₀ sequence] was the most frequent in our population being present in 50.4% of subjects. Allele 24.2 could be associated to Ewing's sarcoma development since it was significantly more frequent among patients. Differences in the global configuration of *NROB1* promoter GGAA microsatellites (size, sequence, amount and position of GGAA repeats and single 'A' base insertions) could result in differences in Ewing's sarcoma susceptibility. All these results will provide insights for the understanding of tumorigenesis.

KEYWORDS: Ewing's sarcoma, *NROB1*, GGAA microsatellites, allele 24.2

INTRODUCTION

To develop new therapeutic approaches to a highly malignant disease as Ewing's Sarcoma is important and necessary to understand the molecular structure and the emergent properties that regulate the promoter of the gene *NROB1*¹. This very aggressive soft tissues and bone tumor that occurs mainly during childhood and early adulthood and is caused by a recurrent chromosomal translocation that encodes EWS/ETS oncoproteins^{1,2,3}. Ewing's sarcoma EWS/FLI, the most important EWS/ETS fusion, regulates a portion of target genes, including the critical oncogenic target *NROB1*, via GGAA microsatellites in their promoter^{4,5}. Because EWS/FLI is also key oncoprotein in various human cancers, Ewing's sarcoma serves as a paradigm for ETS-driven cancers^{4,6}.

The promoter of *NROB1* contains GGAA-microsatellites, consisting of multiple copies of GGAA core motif, with occasional insertions^{4,1}. These GGAA-microsatellites were identified as *EWS/ETS* response elements in Ewing's sarcoma being necessary and sufficient for *EWS/FLI*-mediated regulation of *NROB1*⁴.

EWS/FLI protein binds in GGAA sequences and mechanistic studies demonstrated that the ability of EWS/FLI to bind DNA and modulate gene expression through these repetitive elements depended on the structure of GGAA motifs^{1,4}. It was shown that it is not simply the absolute number of GGAA elements present in a construct that determine the microsatellite's

ability to function as an *EWS/FLI* response elements, but rather the number of consecutive (in tandem) GGAA repeats that is important⁷. Experimental analysis of DNA probes and promoter fragments with variable number of repeats indicated that at least 4 to 5 consecutive GGAA motifs are required for DNA binding and gene activation and that the efficiency of these processes increased with increasing numbers of repeats⁴. Additionally, it was demonstrated that the number of consecutive GGAA repeats as well as the position of the single 'A' base insertions will influence the binding of EWS/FLI oncoprotein to DNA¹.

Here our objective was to identify and describe the molecular structure of GGAA motifs in *NROB1* promoter in unrelated Ewing's Sarcoma patients and healthy subjects from South Brazilian population.

MATERIALS AND METHODS

The Ewing's sarcoma patients (14 female; 10 male; 1 to 21 years old) were diagnosed in the Pediatric Oncology Department, Porto Alegre Clinic Hospital (HCPA), Rio Grande do Sul, Brazil. All the 24 clinic diagnoses were confirmed by medical imaging and biopsies studies. The control group consisted of 200 people without Ewing's sarcoma, geographically matched to the patients. This study was approved by the Research Ethics Committee of each institution. All subjects included in this study gave informed consent.

Leukocyte DNA was amplified in a final volume of 25µl reaction containing 1-10ng of DNA, 12.5µL of Master Mix Multiplex PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), 10 pmol/µL of upstream and downstream primers and 5.0µL of Q Solution (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). PCR was performed on a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems; Life Technologies, Foster, CA, USA) using predenaturation of 38 cycles of 94°C-60s, 57°C-90s and 72°C-30s, and a final extension. The primers used to amplify the targeted regions (design using the Primer3 algorithm; <http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) were 5' - TCTTATGCTGAGAATTCCAGGTC-3' and 5'- AAGAAGAGGGAGGATGGGA-3'. Sequencing reactions were performed in ABI 3730xl DNA Analyzer (96 capillary type). Sequencing reactions were performed in the DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD) using the ABI BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster, CA, USA), following the protocols supplied by the manufacturer. The sequencing had better results for forward single strand DNA, which was used for the proceeding analysis. In all sequences involved in this study we clearly discerned the forward primer followed by a beginning box, GGAA repeats, ending box and finishing with primer reverse (see model on Figure 1). All subjects investigated in this study had the same primers, beginning box and ending box sequences.

RESULTS AND DISCUSSION

The same primers, beginning box and ending box sequences identification allowed us to be sure of the exact starting location of the GGAA repeats. With this accurate information, we

were able to identify the arrangement of GGAA motifs on *NROB1* promoter. A total of 21 different alleles were identified in the 224 subjects, which were classified according to the amount and position of GGAA repeats and single 'A' base insertions (Table 1). The Table shows that all alleles had at least 4 to 5 consecutive GGAA motifs. Using Chi Square Test we compared patients (n=24) with controls (n=200) concerning *NROB1* promoter allele frequencies and total GGAA motifs, total of 'A' insertions, greater number of consecutive GGAA motifs, and total allele base pairs, but no significant differences were found (Figure 2). There was no significant difference between patients and controls even when we tested for the presence of alleles starting by (GGAA)₅A (p=0.1124; Chi Square Test). The 24.2 *NROB1* promoter allele [(GGAA)₇A(GGAA)₇A(GGAA)₁₀ sequence] was the most frequent in our population, being present in 50.4% of all subjects (see Figure 2-A). Interestingly, we detected that 24.2 *NROB1* promoter allele rate was significantly higher in Ewing's sarcoma patients; this allele is present in 70.8% and 48.0% of patients and controls, respectively (p=0.0345; Chi Square Test).

Different numbers of consecutive GGAA repeats on the length of *NROB1* promoter allow different configurations of EWS/FLI binding. In this work we investigated 224 subjects from South Brazil and reported 21 different *NROB1* promoter alleles by sequencing. We noticed an increasing expansion of GGAA motifs interposed by single 'A' bases in each 3 to 15 consecutive GGAA repeats extending by a length of 66 to 395bp of the *NROB1* promoter. Not only patients, but also controls had at least 4 to 5 consecutive GGAA motifs, which are required for EWS/FLI binding. In addition, we reported here that 24.2 *NROB1* promoter allele could be associated to Ewing's sarcoma development since it was significantly more frequent among patients. Because the 24.2 *NROB1* promoter allele has a particular structure, we are able to emphasize that the differences in the global configuration of *NROB1* promoter GGAA microsatellites (size, sequence, amount and position of GGAA repeats and single 'A' base insertions) could result in differences in Ewing's sarcoma susceptibility. Opportunely, should be interesting to analyze allele rates according Ewing's sarcoma medical evolution. All these results will provide insights for the understanding of tumorigenesis.

REFERENCES

1. Gangwal K, Close D, Enriquez CA, et al: Emergent properties of EWS/FLI regulation via GGAA microsatellites in Ewing's sarcoma. *Genes & Cancer* 2:177-187, 2010.
2. Guillon N, Tirode F, Boeva V, et al: The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. *PNAS* 29:10149-10154, 2009.
3. Sorensen PH, Liu XF, Delattre O, et al: Reverse transcriptase PCR amplification of *EWS/FLI-1* fusion transcripts as a diagnostic test for peripheral primitive neuroectodermal tumors of childhood. *Diagn Mol Pathol* 2:147-57, 1993.

4. Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC, et al: Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10149-10154, 2008.
5. Jedlicka P: Ewing sarcoma, an enigmatic malignancy of likely progenitor cell origin, driven by transcription factor oncogenic fusions. *Int J Clin Exp Pathol* 3:338-347, 2010.
6. Delattre O, Zucman J, Plougastel B, et al: Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumors. *Nature* 359:162-165, 1992.
7. Gangwal K, Lessnick SL: Microsatellites are EWS/FLI response elements: genomic "junk" is EWS/FLI's treasure. *Cell Cycle* 20:3127-3132, 2010.

tcttatgctg	agaattccag	gtc	ctggaga	agaagaaaa	gagaaagaaa
gagagagaga	gaaggagtga	gagagggagg	gagggagggg	gggagggagg	
aaggaaggaa	ggaaggaagg	aaggaaagga	aggaaggaag	gaaggaagga	
aggaaaggaa	ggaaggaagg	aaggaaagga	ggaaggaagg	aaggaaggaa	
aagaaacagc	aaaaaaagaa	agagggagga	tgga		

Figure 1. Standard *NROB1* promoter allele with 25 GGAA repeats and two single insertions of 'A' base to show the reference patterns used to know the other alleles; In black up: forward primer; In white up: beginning box; In gray: GGAA repeats allele; In white down: ending box; In black down: reverse primer.

Table 1. Different alleles by GGAA motifs in *NROB1* promoter.

Allele Name*	Total of GGAA motifs	Total of 'A' insertions	Greater number of consecutive GGAA motifs	Total of base pairs**	<i>NROB1</i> promoter allele sequences between beginning and ending boxes
16.2	16	1	11	66	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₁
17.2	17	1	12	70	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₂
18.2	18	1	13	74	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₃
19.2	19	1	14	78	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₄
20.2	20	1	15	80	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₅
21.2	21	2	8	86	(GGAA) ₇ A(GGAA) ₆ A(GGAA) ₈
23.2	23	2	9	94	(GGAA) ₇ A(GGAA) ₇ A(GGAA) ₉
24.2	24	2	10	98	(GGAA) ₇ A(GGAA) ₇ A(GGAA) ₁₀
25.2	25	2	11	102	(GGAA) ₇ A(GGAA) ₇ A(GGAA) ₁₁
26.2-A	26	2	12	106	(GGAA) ₇ A(GGAA) ₇ A(GGAA) ₁₂
26.2-B	26	2	11	106	(GGAA) ₇ A(GGAA) ₈ A(GGAA) ₁₁
26.2-C	26	2	11	106	(GGAA) ₈ A(GGAA) ₇ A(GGAA) ₁₁
27.2-A	27	2	13	110	(GGAA) ₇ A(GGAA) ₇ A(GGAA) ₁₃
27.2-B	27	2	12	110	(GGAA) ₈ A(GGAA) ₇ A(GGAA) ₁₂
28.2	28	2	14	114	(GGAA) ₇ A(GGAA) ₇ A(GGAA) ₁₄
38.3	38	3	13 (x2)	155	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₃ A(GGAA) ₇ A(GGAA) ₁₃
57.6	57	6	12	234	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₀ A(GGAA) ₈ A(GGAA) ₄ A(GGAA) ₁₂ A(GGAA) ₉ A(GGAA) ₉
59.6	59	6	14	242	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₀ A(GGAA) ₈ A(GGAA) ₄ A(GGAA) ₁₄ A(GGAA) ₉ A(GGAA) ₉
60.5	60	5	15	245	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₀ A(GGAA) ₁₁ A(GGAA) ₁₅ A(GGAA) ₉ A(GGAA) ₁₀
75.8	75	8	13	308	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₁ A(GGAA) ₈ A(GGAA) ₄ A(GGAA) ₁₃ A(GGAA) ₄ A(GGAA) ₁₂ A(GGAA) ₉ A(GGAA) ₉
96.11	96	11	13	395	(GGAA) ₅ A(GGAA) ₁₁ A(GGAA) ₆ A(GGAA) ₁₁ A(GGAA) ₁₁ A(GGAA) ₅ A(GGAA) ₈ A(GGAA) ₃ A(GGAA) ₁₀ A(GGAA) ₁₀ A(GGAA) ₅ A(GGAA) ₉ A(GGAA) ₁₃

* The *NROB1* promoter alleles were named using the number of GGAA motifs followed by the number of single "A" insertions (see the second and third columns in this table); Letters -A, -B, and -C were used to discriminate the alleles when the "A" insertions were in different positions.

** The number of base pairs was calculated considering the first nucleotide after the beginning box until the last nucleotide before the ending box (see model in Figure 1).

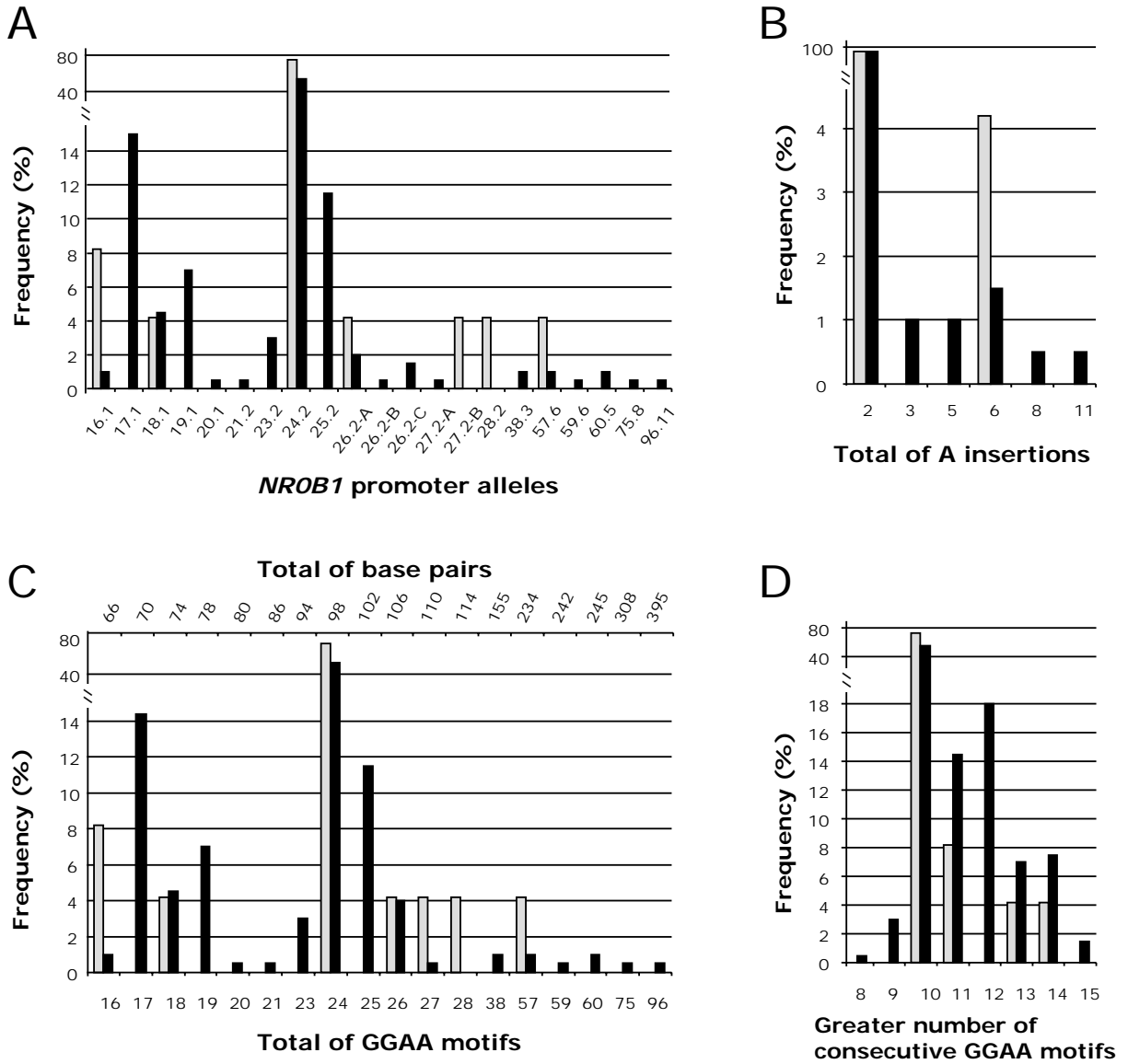


Figure 2. Comparison between patients (n=24; gray) with controls (n=200; black) concerning *NROB1* promoter allele data: A- allele frequencies, B- total of 'A' insertions, C- total of base pairs (up) and total of GGAA motifs (down), D- greater number of consecutive GGAA motifs.

CAPÍTULO 3 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através deste estudo foi possível identificar e descrever a estrutura molecular de motivos de repetição (GGAA)_n na região promotora do gene *NROB1* em pacientes com sarcoma de Ewing não relacionados e indivíduos saudáveis da população do Rio Grande do Sul, Brasil. Com o presente estudo foi possível identificar um total de 21 alelos diferentes em 224 indivíduos estudados. Estes alelos foram classificados de acordo com a quantidade e posição de motivos de repetição GGAA e inserções de base única 'A' (adenina). O teste estatístico qui-quadrado não revelou resultados significativos quando analisadas as frequências alélicas do promotor do gene *NROB1*, entre os pacientes (n=24) e os controles (n=200). O alelo 24.2, correspondente a sequência (GGAA)₇A (GGAA)₇A (GGAA)₁₀, foi o mais frequente tanto na população dos pacientes quanto na população dos controles, estando presente em 50,4% de todos os indivíduos. Além disso, foi possível observar que a taxa do alelo 24,2 foi significativamente maior em pacientes com sarcoma de Ewing (70,8%) do que nos controles (48,0%). Através destes dados foi possível concluir que o alelo 24.2 pode estar associado ao desenvolvimento do sarcoma de Ewing. Levando-se em conta que a proteína quimérica aberrante EWS / FLI apresenta variabilidade de ligação ao DNA que depende da estrutura dos motivos de repetição GGAA (tamanho, sequência, quantidade e posição das repetições) além do local das inserções de base única 'A', podemos afirmar que estas configurações estruturais podem resultar em diferente susceptibilidade ao sarcoma de Ewing. Oportunamente, será interessante analisar as taxas de alelos de acordo com a evolução médica do sarcoma de Ewing.

O entendimento de mecanismos oncogênicos que envolvem membros da família ETS pode levar a novas perspectivas de diagnóstico, prognóstico e abordagens terapêuticas. O presente trabalho vem justamente corroborar com essas perspectivas. No entanto, para que se possa identificar a susceptibilidade de um indivíduo à doenças complexas, como o sarcoma de Ewing, se faz necessária a realização de abordagens envolvendo não só o gene *NROB1* mas também outras estruturas genicas como, por exemplo, segmentos polimórficos e mutados nos genes *EWS* e *FLI*. Uma análise conjunta da herança de cada paciente poderia incrementar resultados e conclusões que venham, em breve, impulsionar a ciência e facilitar o diagnóstico e/ou o prognóstico aos pacientes com sarcoma de Ewing.

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 *NROB1* a uma resposta anormal celular. Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram uma maior frequência do alelo 24.2 em pacientes com

sarcoma de Ewing. Considerando que a literatura experimental tem reportado que mutações no *NROB1* 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 a susceptibilidade ao sarcoma. Há ainda muito que se descobrir sobre o câncer 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 *NROB1* 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, as conclusões foram que:

1- O número de repetições microssatélites (GGAA)_n presentes na sequência do promotor do gene *NROB1* em indivíduos afetados pelo sarcoma de Ewing e em indivíduos não-afetados pertencentes à população do Rio Grande do Sul foi de 3 a 15 consecutivas e 16 a 96, considerando as inserções de base 'A'.

2- A escada alélica de repetições microssatélites (GGAA)_n presentes na sequência do promotor do gene *NROB1* na população estudada mostrou variar de 66 a 395 pares de bases, com 21 tipos diferentes de alelos.

3- Ao comparar as frequências alélicas entre o grupo de indivíduos afetados pelo sarcoma de Ewing e o grupo de indivíduos não-afetados não-aparentados foi observada uma frequência significativamente mais elevada do alelo 24.2 entre os pacientes.



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

OF.CEP-571/11

Porto Alegre, 08 de abril de 2011.


Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05423 intitulado **“Microsatélites (GGAA)_n no promotor do gene NROB1 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