

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

# Protocolo Latino-Americano de Sarcoma de Ewing: um estudo sobre as características clínicas e patológicas dos pacientes.

**Andre Tesainer Brunetto**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler. Tese como requisito parcial para obtenção de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas

Porto Alegre

Ano 2023

## CIP - Catalogação na Publicação

Brunetto, Andre Tesainer

Protocolo Latino-Americano de Sarcoma de Ewing: um estudo sobre as características clínicas e patológicas dos pacientes. / Andre Tesainer Brunetto. -- 2023. 58 f.

Orientador: Rafael Roesler.

Coorientador: Caroline Brunetto de Farias.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Sarcoma, Ewing. 2. Neuroectodermal Tumors, Primitive. 3. Immunohistochemistry. 4. Pathology. 5. RNA-Binding Protein EWS. I. Roesler, Rafael, orient. II. de Farias, Caroline Brunetto, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

# Protocolo Latino-Americano de Sarcoma de Ewing: um estudo sobre as características clínicas e patológicas dos pacientes.

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas (PPGCM)

Aprovado em: 23/07/2023

## BANCA EXAMINADORA

Prof. Maira Rozenfeld Olchik - Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas (PPGCM- UFRGS)

Prof. Renato Marchiori Bakos - Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas (PPGCM-UFRGS)

Prof. Lauro Gregianin – Universidade federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Dr. Caroline B de Farias - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

*Epígrafe: “Aprender é, de longe, a maior recompensa”. William Hazlitt.*

**Agradecimentos:**

*Aos Pais, Esposa e filhos. Pela educação e suporte.*

*Aos colegas de trabalho. Pela ajuda no dia a dia.*

*Ao Prof. Rafael pelo incentivo e visão estratégica.*

## RESUMO

*Introdução:* O Sarcoma de Ewing (SE) e o Tumor Neuroectodérmico Periférico (PNET) são tumores pequenos, redondos, de células azuis da infância e adolescência, que apresentam translocação cromossômica EWS em 85% dos casos, e imuno-histoquímica com expressão de superfície glicoproteína CD99. O diagnóstico pode ser desafiador e requer um patologista experiente em tumores ósseos e malignidades pediátricas. *Métodos:* O estudo atual do Grupo Cooperativo Latino-Americano de Sarcoma foi projetado para determinar a eficácia e segurança de um regime de quimioterapia com intervalo comprimido e a incorporação de quimioterapia metronômica para pacientes com SE recém-diagnosticada. Os relatórios de patologia de todos os centros com painel de imuno-histoquímica e translocações EWS foram recuperados dos prontuários médicos retrospectivamente e são descritos juntamente com dados demográficos e dados prognósticos e de sobrevida. *Resultados:* Foram analisados 400 pacientes em 31 centros com laudos completos de patologia. A translocação EWS foi feita em 20% dos pacientes (87/400). A Argentina realizou confirmação genética em pelo menos 40% dos pacientes, enquanto centros no Brasil, Chile e Uruguai somente solicitam quando o diagnóstico diferencial é necessário. NKX2-2 foi realizado em 61 pacientes (15,25%) e foi positivo em 95% dos casos. 7,5% dos pacientes foram diagnosticados com PNET. Os marcadores de diferenciação muscular mais frequentes foram a desmina e a miogenina. A sinaptofisina parece ser o marcador neural mais frequente, juntamente com LCA/CD45 e TdT como marcadores linfóides. Marcadores diferenciais epiteliais não foram comumente solicitados, mas foram positivos em cerca de 10% dos casos. O KI67 foi analisado em menos de 20% dos pacientes e a maioria apresentou índice alto (>30%). A idade mediana ao diagnóstico foi de 10,72 anos (variação de 0,02 a 32,85 anos). Os membros inferiores foram o local de tumor primário mais frequente (28,3%), seguido de tórax (21,9%), pelve (16,8%). A taxa de resposta geral foi de 82,5% (RC 18,8%, PR 63,6%), enquanto 10 pacientes (3,3%) apresentaram doença progressiva (DP). A ressecção cirúrgica do tumor foi realizada em 160 (50,8%) pacientes, cirurgia em combinação com radioterapia em 71 (28%) pacientes e radioterapia isolada em 51 (21%) pacientes. A análise da resposta histológica à quimioterapia pré-operatória de acordo com os critérios do Índice de Necrose (NI) foi determinada em 123 pacientes, e a distribuição mostrou que 54,5% e 45,5% tinham NI <99% e 100%, respectivamente. *Conclusão:* A implementação de um protocolo multi-institucional foi viável com resultados comparáveis aos de grupos em países de alta renda e protocolos internacionais. Apenas uma minoria de pacientes realiza testes moleculares para conformação da translocação e imuno-histoquímica com painel amplo de marcadores, provavelmente devido aos recursos limitados. Uma colaboração de investigadores está em andamento para padronizar o diagnóstico patológico e os testes moleculares nos pacientes sul-americanos.

*Palavras-Chave:* Sarcoma, Ewing; Tumores Neuroectodérmicos Primitivos; Imuno-histoquímica; Patologia; Prognóstico, Estudos Clínicos.

## ABSTRACT

*Introduction:* Ewing's Sarcoma (ES) and Peripheral Neuroectodermal Tumor (PNET) are small, round, blue cell tumors of childhood and adolescence, that present a reciprocal chromosomal translocation between chromosomes 11 and 22 in 85% of cases and immunohistochemistry with expression of CD99. Diagnosis may be challenging and requires an experienced pathologist. *Methods:* The Latin American Cooperative Group on Ewing's Sarcoma current study was designed to determine the efficacy and safety of an interval compressed-chemotherapy regimen and the incorporation of metronomic chemotherapy for newly diagnosed ES. Pathology reports for immunohistochemistry and EWS translocations were retrieved from medical records retrospectively. *Results:* 400 patients in 31 centers were analyzed for pathology. EWS translocation was done in 20% patients (87/400). Argentina seems to be able to provide the genetic confirmation for ES in at least 40% of patients, while centers in Brazil, Chile and Uruguay only request when the diagnosis is challenging. NKX2-2 was done in 61 patients (15.25%) and was positive in 95% of cases. A total 7,5% patients were diagnosed with PNET. The most frequent muscular differentiation markers were desmin and miogenin. Synaptophysin seems to be the most frequent neural marker, along with LCA/CD45 and TdT as lymphoid markers. Epithelial differential markers were not commonly requested but were positive in around 10% cases. KI67 was analyzed in less than 20% of patients and the majority presented with a high index (>30%). The median age at diagnosis was 10.72 years (range 0.02 to 32.85 years). Lower limbs were the most frequent primary tumor site (28.3%), followed by chest (21.9%), pelvis (16.8%). Overall response rate was 82.5% (CR 18.8%, PR 63.6%), while 10 patients (3.3%) had progressive disease (PD). Surgical tumor resection was performed in 160 (50.8%) patients, surgery in combination with radiation in 71 (28%) patients, and radiation alone in 51 (21%) patients. Analysis of histological response to preoperative chemotherapy according to Necrosis Index (NI) criteria was determined in 123 patients, and the distribution showed that 54.5% and 45.5% had NI <99% and 100%, respectively. *Conclusion:* Implementation of a multi-institutional protocol was feasible and resulted in outcomes that are comparable to those of groups in high-income countries. Only a minority of patients perform molecular testing and broad panel immunohistochemistry due to limited resources. Further collaboration is underway to standardize pathological diagnosis and molecular testing.

*Key words:* RNA-Binding Protein EWS; Sarcoma, Ewing; Neuroectodermal Tumors, Primitive; Immunohistochemistry; Pathology; Prognosis, Clinical Studies.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Patologia Sarcoma de Ewing.....	24
Figura 2 – Marco Conceitual.....	28
Tabela 1 – Busca DeCS/MeSH.....	14
Tabela 2 – Busca NCBI termos.....	14
Tabela 3 – Protocolo anatomopatológico do protocolo SE.....	26
Tabela 4 – Resposta patológica de indução à quimioterapia.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Adria	Adriamicina
AMO	Aspirado de Medula Óssea
BMO	Biópsia de Medula Óssea
Ca	Cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COG	Childens Oncology Group
Cr	Creatinina
CTV	<i>Clinical Target Volume</i> : Volume Clínico Alvo
CTX	Ciclofosfamida
DCE	Depuração de Creatinina Endógena
DE	Doença Estável
DHL	Desidrogenase láctica
DOXO	Doxorrubicina / Doxo
DP	Doença em Progressão
ETS	<i>Erythroblast Transformation Specific gene</i>
EWS	<i>Ewing sarcoma gene</i>
EBV	Epstein Barr Vírus
ECG	Eletrocardiograma
FA	Fosfatase Alcalina
GCP	<i>Good clinical practice</i> : Boas práticas clínicas
HE	Hematoxilina e eosina
IE	Ifosfamida e Etoposide
ICI	Instituto do Câncer Infantil
IFO	Ifosfamida



ICE	Ifosfamida, carboplatina e etoposide
LDH	Desidrogenase láctica
FLI-1	<i>Friend leukemia integration 1</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
PAS	Periodic acid–Schiff
PCR-RT	Reverse transcription polymerase chain reaction
PNET	Tumor Neuroectodérmico Periférico
PET-CT	Tomografia por emissão de pósitrons
QT	Quimioterapia
RECIST	CrITÉrios de Avaliação da Resposta em Tumores Sólidos
RC	Remissão Completa
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
RP	Remissão Parcial
RT	Radioterapia
RX	Raio-X
SEO	Sarcoma de Ewing Ósseo
SEPM	Sarcoma Ewing de partes moles
SLE	Sobrevida Livre Eventos
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SG	Sobrevida Global
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFE	Tumores da Família Ewing
TGO	Aspartato Aminotransferase
TGP	Alanina Aminotransferase
TBI	<i>Total Body Irradiation</i>
TTPA	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

VBL	Vimblastina
VCR	Vincristina
VAdrC	Vincristina, Adriamicina e Ciclofosfamida
VOD	Doença Hepática Venó-Oclusiva
VP-16	Etoposide

## SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2. BUSCA DE DADOS.....	14
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	16
a. Introdução .....	16
b. Estadiamento.....	17
c. Tratamento local .....	18
d. Tratamento sistêmico... ..	18
e. Estratégias tratamento para SE metastático. ....	20
f. Terapia alvo .....	21
g. Experiencia grupo cooperativo SE.....	22
h. Patologia .....	24
4. MARCO CONCEITUAL.....	28
5. JUSTIFICATIVA.....	28
6. OBJETIVOS.....	29
7. ARTIGO.....	30
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	45
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

O sarcoma de Ewing e o Tumor Neuroectodérmico Periférico (PNET) são tumores de células pequenas, redondas e azuis da infância e adolescência, de comportamento clínico agressivo. Apresentam de forma consistente uma translocação cromossômica recíproca entre os cromossomas 11 e 22, t(11;22) (q24;q12) em 85% dos casos e imuno-histoquímica com expressão da glicoproteína de superfície CD99 (Bernstein ,2006; Whang-Peng, 1984; Mc Keon , 1998; Ambros, 1991), em comum.

O sarcoma de Ewing geralmente compromete em forma primária o osso e frequentemente se estende às partes moles próximas, também pode ser primariamente um tumor de partes moles. O PNET pode comprometer inicialmente ossos ou partes moles, porém é mais comumente um tumor de partes moles. Estes tumores respondem de maneira similar a poli quimioterapia e são considerados atualmente como variantes de um mesmo tumor derivado de elementos neuroepiteliais, constituindo os Tumores da Família Ewing (TFE). O Tratamento padrão consiste em quimioterapia de indução, tratamento local com cirurgia e/ou radioterapia e quimioterapia de consolidação (Womer RB, 2012; Anderton J, 2020; Chin M, 2020; Mora J, 2017; Leavey PJ, 2021).

Em oncologia pediátrica, pacientes tratados dentro de centros de referência (Arancibia, 2021) e seguindo protocolos clínicos tem suas chances de cura aumentadas. Com o objetivo de aumentar a sobrevida destes pacientes se organizou o Grupo Cooperativo Latino-Americano de Sarcoma de Ewing. O Instituto do Câncer Infantil (ICI), através do seu Departamento de Pesquisa Clínica, coordena o protocolo Latino-Americano de Sarcoma de Ewing há aproximadamente 2 décadas. O objetivo inicial que seria padronizar o tratamento nos principais centros do Brasil, Argentina, Chile e Uruguai está consolidado. O segundo estudo do grupo (EWING2) está fechado para recrutamento e está avaliando a associação de intervalo compressivo e quimioterapia metronômica em pacientes recém diagnosticados.

A utilização de uma plataforma eletrônica de banco de dados e a manutenção de um grupo de monitores clínicos que auxiliam na coleta dos dados clínicos nos diversos centros deram robustez ao estudo cooperativo EWING2, à semelhança dos estudos multicêntricos internacionais da indústria farmacêutica. Mais recentemente, o grupo cooperativo possibilitou aos sub investigadores do protocolo a discussão dos casos clínicos por telemedicina, facilitando assim, que centros participantes tenham acesso a especialistas que ajudam na definição da melhor conduta diagnóstica e terapêutica para cada participante do estudo.

Durante os vários anos de condução destes dois estudos clínicos (EWING 1 e 2) houve um sólido aprendizado que permitiu à equipe do ICI ampliar a rede de hospitais que aderem ao protocolo, melhorar a metodologia de coleta de dados, capacitar e treinar toda a equipe de pesquisa envolvida, discutir os casos clínicos, e profissionalizar o gerenciamento do estudo. Isto permitiu seguir as melhores práticas

clínicas na condução de estudos clínicos (Código de Nuremberg, Resolução 466/2012, GCP “*Good Clinical Practice*”).

Durante os anos de condução, ficou perceptível a identificação em nossa população de um número particularmente elevado de pacientes portadores de doença metastática (aproximadamente 40%) ao diagnóstico, quando comparado com instituições de referência nos EUA e Europa (20-25%) (Bernstein et al., 2006; Brunetto et al., 2015; Esiashvili et al., 2008; Marina et al., 1989; Rodríguez-Galindo et al., 2007). A alta incidência de doença avançada pode refletir a associação de múltiplos fatores relacionados ao acesso e eficiência ao sistema de saúde, mas pode também envolver particularidades biológicas nos tumores da nossa população. Considerando que aparentemente não há diferença de tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico nos pacientes diagnosticados no Brasil quando comparados com dados de pacientes de instituições internacionais de referência, fica evidente a necessidade de se compreender do ponto de vista epidemiológico as causas que podem estar relacionadas à maior incidência de doença avançada em nossa população.

Além disso, é importante reconhecer a possibilidade de existirem peculiaridades biológicas na população Latino-americana. Por isso, recentemente foi criado o Comitê Científico de Estudos Biológicos em Sarcoma de Ewing. A primeira etapa desta parceria é identificar as características clínico-patológicas dos pacientes tratados dentro do EWING2 [disponível online: <https://ensaiosclinicos.gov.br/> Número do CAAE: 0187.1.001.000-10]

A presente tese de dissertação de doutorado tem como objetivo fazer uma revisão da literatura sobre o manejo clínico do sarcoma de Ewing e realizar uma revisão das características clínicas e patológicas dos pacientes tratados dentro do protocolo Latino-Americano, além de explorar variáveis prognósticas. A metodologia utilizada e os principais procedimentos do estudo serão apresentados dentro do artigo científico. Este estudo contribuirá para o entendimento epidemiológico da doença na América Latina e será importante para definir as próximas etapas para desenvolvimento do próximo estudo (EWING3).

Não serão apresentados os dados do resultado da randomização, eficácia da terapia metronômica ou dados de segurança do protocolo nesta tese de doutorado. Pacientes sem dados completos de patologia e de imuno-histoquímica foram excluídos deste estudo.

## 2. CRITÉRIOS DE BUSCA DADOS

Para procura do termo mais adequado foi consultada a página descritores ciência em saúde com acesso online no dia 30/03/2022 disponível em: <https://decs.bvsalud.org/>

TABELA 1. BUSCA DeCS/MeSH

Busca DeCS/MeSH	Descritores	Identificador Único RDF
<b>Sarcoma Ewing</b>	RNA-Binding Protein EWS	<a href="https://id.nlm.nih.gov/mesh/D034802.html">https://id.nlm.nih.gov/mesh/D034802.html</a>
	Sarcoma, Ewing	<a href="https://id.nlm.nih.gov/mesh/D012512.html">https://id.nlm.nih.gov/mesh/D012512.html</a>
<b>PNET</b>	Neuroectodermal Tumors, Primitive	<a href="https://id.nlm.nih.gov/mesh/D018242.html">https://id.nlm.nih.gov/mesh/D018242.html</a>
<b>Imuno-Histoquímica</b>	Immunohistochemistry	<a href="https://id.nlm.nih.gov/mesh/D007150.html">https://id.nlm.nih.gov/mesh/D007150.html</a>
<b>Patologia</b>	Pathology	<a href="https://id.nlm.nih.gov/mesh/D010336.html">https://id.nlm.nih.gov/mesh/D010336.html</a>
<b>Prognóstico</b>	Prognosis	<a href="https://id.nlm.nih.gov/mesh/D011379.html">https://id.nlm.nih.gov/mesh/D011379.html</a>
<b>Estudos Clínicos</b>	Clinical studies	<a href="https://id.nlm.nih.gov/mesh/D000068456.html">https://id.nlm.nih.gov/mesh/D000068456.html</a>

TABELA 2. Busca NCBI

Busca: <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/advanced/">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/advanced/</a>	Artigos
("sarcoma, ewing"[MeSH Terms] OR ("sarcoma"[All Fields] AND "ewing"[All Fields]) OR "ewing sarcoma"[All Fields] OR ("ewing"[All Fields] AND "sarcoma"[All Fields]) OR ("neuroectodermal tumors, primitive, peripheral"[MeSH Terms] OR ("neuroectodermal"[All Fields] AND "tumors"[All Fields] AND "primitive"[All Fields] AND "peripheral"[All Fields]) OR "peripheral primitive neuroectodermal tumors"[All Fields] OR "pnet"[All Fields] OR "neuroectodermal tumors, primitive"[MeSH Terms] OR ("neuroectodermal"[All Fields] AND "tumors"[All Fields] AND "primitive"[All Fields]) OR "primitive neuroectodermal tumors"[All Fields])) AND ("pathology"[MeSH Terms] OR "pathology"[All Fields] OR "pathologies"[All Fields] OR "pathology"[MeSH Subheading]) AND ("clinical trial"[Publication Type] OR "clinical trials as topic"[MeSH Terms] OR "clinical trials"[All Fields])	893
("sarcoma, ewing"[MeSH Terms] OR ("sarcoma"[All Fields] AND "ewing"[All Fields]) OR "ewing sarcoma"[All Fields] OR ("ewing"[All Fields] AND "sarcoma"[All Fields]) OR ("neuroectodermal tumors, primitive, peripheral"[MeSH Terms] OR ("neuroectodermal"[All Fields] AND "tumors"[All Fields] AND "primitive"[All Fields] AND "peripheral"[All Fields]) OR "peripheral primitive neuroectodermal tumors"[All Fields] OR "pnet"[All Fields] OR "neuroectodermal tumors, primitive"[MeSH Terms]	87

<p>OR ("neuroectodermal"[All Fields] AND "tumors"[All Fields] AND "primitive"[All Fields]) OR "primitive neuroectodermal tumors"[All Fields])) AND ("immunohistochemistries"[All Fields] OR "immunohistochemistry"[MeSH Terms] OR "immunohistochemistry"[All Fields]) AND ("clinical trial"[Publication Type] OR "clinical trials as topic"[MeSH Terms] OR "clinical trials"[All Fields])</p>	
<p>("sarcoma, ewing"[MeSH Terms] OR ("sarcoma"[All Fields] AND "ewing"[All Fields]) OR "ewing sarcoma"[All Fields] OR ("ewing"[All Fields] AND "sarcoma"[All Fields]) OR ("neuroectodermal tumors, primitive, peripheral"[MeSH Terms] OR ("neuroectodermal"[All Fields] AND "tumors"[All Fields] AND "primitive"[All Fields] AND "peripheral"[All Fields]) OR "peripheral primitive neuroectodermal tumors"[All Fields] OR "pnet"[All Fields] OR "neuroectodermal tumors, primitive"[MeSH Terms] OR ("neuroectodermal"[All Fields] AND "tumors"[All Fields] AND "primitive"[All Fields]) OR "primitive neuroectodermal tumors"[All Fields])) AND ("immunohistochemistries"[All Fields] OR "immunohistochemistry"[MeSH Terms] OR "immunohistochemistry"[All Fields]) AND ("prognosis"[MeSH Terms] OR "prognosis"[All Fields] OR "prognoses"[All Fields])</p>	994

O artigo completo de todos os estudos elegíveis foi obtido para avaliação da qualidade e extração de dados. A bibliografia dos artigos revisados foi usada para buscar outros artigos que fossem de relevância clínica e científica para a elaboração desta tese de doutorado. Foram ainda consultados livros-textos, manuais de tratamento, diretrizes terapêuticas e documentos de consensos de sociedades de especialidades médicas nacionais e internacionais.

Foi avaliado um total de 1974 artigos através dos termos da busca. Um total de 79 artigos foi selecionado através dos objetivos da pesquisa para uma avaliação completa contemplando artigos relacionados com diagnóstico de patologia e imuno-histoquímica, marcadores prognósticos, e ainda selecionados ECR de relevância clínica. Quando houvesse mais de uma meta-análise ou revisões sistemáticas sobre o mesmo tema, a mais recente foi considerada.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Introdução

Os Tumores da “família” Ewing (TFE) incluem o Sarcoma de Ewing Ósseo (SEO), o Sarcoma de Ewing de Partes Moles (SEPM), o Tumor Neuroectodérmico Primitivo (PNET) ou Neuroepitelioma Periférico e o Tumor de Askin (PNET da parede torácica). Os TFE ocorrem mais frequentemente na segunda década de vida e representam aproximadamente 3-4% das neoplasias malignas que incidem em crianças e adolescentes. A incidência em meninos é levemente superior que em meninas (1,1:1). (Askin FB, 1979; Bernstein M, 2006).

Os pacientes frequentemente apresentam dor localizada e progressiva podendo estar presente uma tumoração endurecida e dolorida à palpação. Lesões próximas às articulações podem limitar os movimentos enquanto tumores próximos à coluna vertebral e sacra determinam sintomas pela irritação ou compressão das raízes nervosas. Nos casos de doença avançada os TFE podem determinar febre, perda de peso, anemia e prostração (Widhe B, 2000).

Os fatores prognósticos mais importantes estão relacionados ao sítio do tumor primário, ao volume tumoral e à presença de metástases. Nos SEO os sítios mais favoráveis são extremidade distal e localização central (crânio, clavícula, vértebras e costelas). Os tumores axiais irressecáveis ou de localização pélvica estão associados a um prognóstico mais desfavorável (Cotteril SJ, 2000). Pacientes com doença extra esquelética tem um melhor prognóstico (Cash T, 2016). O volume ou o tamanho do tumor também apresentam importância prognóstica (Paulussen M, 2001; Bacci G, 1998); as lesões maiores tendem a ocorrer nos sítios mais desfavoráveis (Donaldson SS, 1998). Crianças pequenas apresentam uma sobrevida livre de eventos (SLE) mais favorável que adolescentes e adultos jovens (Rosito P, 1998; Shankar AG, 1999; Cotteril SJ, 2000).

Meninas com SEO têm melhor prognóstico que meninos (Shankar AG, 1999). A presença de febre, anemia e DHL elevada são fatores prognósticos desfavoráveis para os pacientes com SEO (Bacci G, 1999; Cotteril SJ, 2000). Nível sérico aumentado de DHL ao diagnóstico correlaciona-se com doença metastática e uma SLE desfavorável (Bacci G, 1999). A ressecabilidade cirúrgica também é uma variável importante, tanto a ressecção incompleta como a completa (mas com margens microscópicas) estão associadas a um pior prognóstico, quando comparado a pacientes com ressecção com margens livres (Raney RB, 1997; Ahmad R, 1999).

Apesar das lesões metastáticas ao diagnóstico serem diagnosticadas em 20 a 30% dos pacientes com SEO e em aproximadamente 13% dos SEPM (Raney RB, 1997), acredita-se que esteja presente na maioria dos pacientes, pois a recaída ocorre em 80 a 90% dos pacientes submetidos apenas a tratamento local (cirurgia completa e/ou radioterapia). A sobrevida melhora significativamente com o acréscimo da quimioterapia



sistêmica (QT), determinando uma SLE em 5 anos de 70% e em 10 anos de 50% (Cotteril SJ, 2000; Paulussen M, 2001; Womer RB, 2012; Anderton J, 2020; Chin M, 2020; Mora J, 2017; Leavey PJ, 2021).

O prognóstico para os pacientes com doença metastática é desfavorável, mesmo com a utilização de QT intensiva. Entre os pacientes com doença metastática, os portadores de metástases pulmonares apresentam uma sobrevida superior àqueles com metástases ósseas ou na medula óssea. Ainda não foi identificado qualquer fator ambiental associado a um maior risco para desenvolvimento destes tumores. A exposição prévia à QT ou radioterapia também não parece influenciar a incidência dos TFE (Buckley JD, 1998; McKeen EA, 1983; Novakovic B, 1994; Yamamoto 1969; Spunt SL, 2006).

### **3.2 Estadiamento**

Nos tumores ósseos a radiografia convencional pode fornecer informações importantes para o diagnóstico. Usualmente se observa uma lesão permeativa com componente de destruição óssea, elevação do periósteo (triângulo de Codman) e comprometimento de partes moles sem calcificações no seu interior (Rud NP, 1989; Widhe B, 2000). A TC e a RNM complementam a investigação, permitindo identificar os detalhes do tumor e sua relação com as estruturas anatômicas. A cintilografia óssea do corpo inteiro, TC tórax e biópsia e aspirado de medula óssea são fundamentais para o rastreamento de metástases. O nível sérico de desidrogenase láctica (LDH), se elevado ao diagnóstico, pode ser útil para auxiliar a monitorar a resposta ao tratamento.

A cintilografia óssea do corpo inteiro para avaliação de metástases ósseas é obrigatória. Pacientes com exames de laboratório normais e exames de imagem (incluindo obrigatoriamente cintilografia óssea) negativos, fica a critério médico complementar com avaliação da medula óssea; demais casos se recomenda fortemente realizar para completar estadiamento. A importância da identificação de transcritos na medula óssea, através da análise molecular, para o estadiamento ainda se encontra sob avaliação e estudos adicionais são necessários antes de recomendação de rotina (Schleiermacher, 2003; Kopp, 2014).

Ainda não há um consenso sobre a superioridade das informações fornecidas pelo exame de PET scan sobre a cintilografia óssea e a TC de tórax na identificação de metástases, entretanto este exame tem sido muito útil na monitorização da resposta ao tratamento (Volker T, 2007; Hawkins DS, 2005, Albano D, 2020, Aryal A, 2021). Em relação a micro metástases pulmonares, PET não foi superior a TC convencional, mas pode ser superior em avaliar metástases ósseas em comparação à cintilografia (Ruggiero A, 2018). Pacientes com acometimento de medula óssea tem uma sobrevida global prejudicada como varável independente de prognóstico (Thiel U, 2016).

### **3.3 Tratamento Local**

O controle local pode ser obtido com cirurgia e/ou radioterapia. A cirurgia é geralmente a opção preferida quando a lesão é ressecável (Rodriguez-Galindo, 2000; Hoffmann, 1999; Yaw, 1999). A superioridade da cirurgia para controle local nunca foi testada em estudos randomizados prospectivos. A aparente superioridade pode representar viés de seleção, já que lesões menores, mais periféricas são normalmente tratadas com cirurgia, enquanto lesões maiores, mais centrais, são mais frequentemente tratadas com radioterapia (Shamberger, 2000). Em crianças pequenas com SEO, a cirurgia pode ter menos morbidade tardia que a radioterapia (que pode causar retardo do crescimento ósseo e risco de neoplasia secundária). Outro benefício potencial da cirurgia é a possibilidade de conhecer o grau de necrose no tumor ressecado, já que sabemos que existem piores resultados em pacientes com baixo grau de necrose. No estudo francês EW88 (29) a SLE para pacientes com < 5%, entre 5-30% e >30% de células viáveis foi de 75%, 48% e 20%, respectivamente (Kuttsch, 1996). Radioterapia pode ser usado também para controle local de lesões metastáticas (Casey DL, 2015).

A radioterapia deve ser utilizada para pacientes com tumores irressecáveis e para pacientes com margens inadequadas (Albergo JI, 2018; Gaspar N, 2015). A dose de radioterapia é usualmente de 5600 cGy. Um estudo randomizado com 40 pacientes com SEO usando 5580 cGy no leito tumoral mais 2 cm de margem, comparado com a mesma dose no leito tumoral e 3960 cGy a todo o osso, não demonstrou diferenças tanto em termos de controle local quanto em SLE (Oberlin, 2001). O uso de radioterapia hiperfracionada não parece influir no controle local nem diminuir morbidade (Womer, 2000). Alguns pacientes podem se beneficiar de ressecção cirúrgica após radioterapia (Gaspar N, 2015). Um estudo retrospectivo demonstrou que pacientes que receberam 6000 cGy ou mais tinham uma incidência de 20% de neoplasia secundária; aqueles que receberam entre 4800-6000 cGy a incidência era de 5% e para aqueles com < 4800 cGy nenhum desenvolveu neoplasia secundária (Paulussen, 1998;). Uma meta análise recente demonstrou superioridade de cirurgia com ou sem radioterapia versus radioterapia isolada (Zhu H, 2020). Nosso grupo publicou dados recentes de controle local e pacientes tratados com radioterapia exclusiva apresentaram piores resultados (Becker, 2017).

### **3.4 Tratamento Sistêmico**

Além do tratamento local com cirurgia e/ou radioterapia, todos os pacientes com TFE devem receber tratamento sistêmico com quimioterapia. Mesmo aqueles com doença localizada ao diagnóstico devem receber tratamento sistêmico em virtude da possibilidade de ter doença metastática oculta (Wunder, 1999; Oberlin, 2001; Evans, 1991; Nilbert, 1998). O tratamento quimioterápico standard no presente consiste em uma combinação de vincristina (V), Adriamicina (Adria) e ciclofosfamida (C), normalmente denominada VAdriaC alternado com ifosfamida (I) e etoposide (VP-16), normalmente denominada IE (Grier, 1994). A importância de Adriamicina tem sido claramente identificada em estudos randomizados (Nesbit, 1990); o aumento da dose intensidade de Adriamicina durante a

fase precoce do tratamento se traduz em SLE superior (Nesbit, 1990; Smith, 1991). Estes achados têm diminuído o interesse no uso de actinomicina-D na maioria dos protocolos mais recentes. O benefício do acréscimo de IE no tratamento de pacientes com TFE tem sido demonstrado tanto em estudos clínicos não randomizados quanto em estudos randomizados (Grier, 1994; Craft, 1998) e hoje está incluído nos regimes utilizados pela maioria dos grupos cooperativos para amento de pacientes com TFE.

O Children's Oncology Group (COG) desenvolveu um estudo randomizado em pacientes com doença localizada comparando o esquema VAdriaC + IE administrado a intervalo de 21 dias com o mesmo esquema, porém com intervalo de 14 dias ("interval compression") com o objetivo de avaliar o benefício do aumento na dose intensidade. Foram elegíveis 568 pacientes, sendo randomizados 284 pacientes para cada braço. O tempo médio de intervalo entre os ciclos de QT no Regime A foi de 23,3 dias e no Regime B foi de 18,5 dias. A SLD em 3 anos foi de 65% para o Regime A e de 76% para o Regime B,  $p=0.02$ . A ocorrência de toxicidade e o número de dias de internação hospitalar foram similares entre os regimes. Os autores concluíram que o regime com intervalo de 2 semanas entre os ciclos foi mais eficaz do que o regime convencional (Womer, 2008). Este estudo ainda é aceito como tratamento padrão para doença localizada até os dias atuais (Womer RB, 2012). Existe uma série de estudos clínicos com resultados semelhantes, porém não existe um concordância sobre qual a melhor opção, contudo há consenso sobre quais as drogas que são mais eficazes e que não se pode prescindir (Womer RB, 2012; Anderton J, 2020; Chin M, 2020; Mora J, 2017; Leavey PJ, 2021). O estudo europeu utilizando uma combinação de tratamento padrão com intervalo comprimido em pacientes com doença localizada utilizando com vincristina, topotecano e ciclofosfamida mostrou taxas de sobrevida livre de eventos e sobrevida global em 5 anos de, 78 e 87%, respectivamente. Não houve diferença entre os braços randomizados (Leavey PJ, 2021).

A presença de doença disseminada tem se constituído o fator prognóstico mais desfavorável para esses tumores. Os resultados do tratamento dos pacientes com 15 metástases pulmonares, ósseas e/ou medula óssea ao diagnóstico tem sido desalentadores, (Cangir A, 1990; Cotterill SJ, 2000), porém sendo mais favorável para os pacientes com metástases pulmonares isoladas (Sandoval C, 1996). A radioterapia pulmonar bilateral tem melhorado a sobrevida dos pacientes com metástases pulmonares, assim como a irradiação dos sítios ósseos metastáticos junto com o manejo dos tumores primários (Whelan JS, 2002).

### 3.5 Estratégias de Tratamento para SE metastático

Considerando os resultados desalentadores do tratamento com QT convencional para este grupo de pacientes, investiu-se no passado em tratamentos mais intensivos. Em um primeiro estudo alemão, 17 pacientes com tumores recidivados ou recentemente diagnosticados, foram tratados com TBI (12 Gy), melfalan altas doses (60-90 mg/m<sup>2</sup>) e etoposide (40-60 mg/kg), com ou sem carboplatina, seguido pela administração de stem cell autólogo mais fatores de crescimento; obtendo uma SLE em 5 anos de 45% (30). Um protocolo com bussulfan, melfalan e tiotepa, com ou sem irradiação corporal total (TBI) e com resgate de stem cell periférico mostrou uma melhora na SLE em 36 meses, alcançando 36% no grupo com TBI no condicionamento (Burdach S, 1993).

Todas as séries que incluíram pacientes com este perfil têm mostrado resultados igualmente insatisfatórios, inclusive utilizando agentes ativos para SE/PNET (ciclofosfamida, ifosfamida, doxorubicina, dactinomicina, vincristina, etoposide) em doses standard durante períodos prolongados ou em doses de regimes intensivos por períodos mais breves, mesmo com a inclusão de ifosfamida com ou sem etoposide. A leucemia secundária emerge como o maior risco com este esquema de tratamento (Kushner BH, 2001).

O grupo francês avaliou a utilização de QT convencional (ciclofosfamida, doxorubicina, ifosfamida e etoposide) em 97 pacientes com SE/PNET metastático, mais consolidação com altas doses de QT contendo bussulfan e melfalan, em 75 pacientes. A SLE em 5 anos para todos os pacientes foi de 37% e a SLE após o transplante foi de 47%. A SLE para os 44 pacientes com metástases pulmonares foi 52% e de 36% para os pacientes com metástases ósseas. Dos 23 pacientes com metástases de medula óssea apenas um sobreviveu. Concluiu-se que esta modalidade de tratamento poderia ser benéfica para pacientes com metástases pulmonares ou ósseas (Oberlin O, 2006). Alguns estudos investigaram o papel da quimioterapia de altas doses e resgate com transplante de células tronco hematopoiéticas para pacientes com resposta histológica insatisfatória contudo sem resultados consistentes (Haveman LM, 2021).

Apenas poucos estudos no passado demonstraram uma melhora na sobrevida em pequenos grupos de pacientes de alto risco (SE recorrente ou metastático) utilizando transplantes em tandem (Hawkins D, 2000; Adams R, 2000). A seleção de pacientes de muito alto risco, sem tratamento prévio, considerando pacientes metastáticos para ossos e medula óssea, com boa resposta a QT foi a chave para o manejo no contexto de estudos clínicos controlados. Contudo os dados permanecem inconclusivos até a última atualização do EuroEwing e quimioterapia em altas doses não podem ser considerado tratamento padrão (Dirksen U, 2019).

### 3.6 Terapia Alvo

Além de estratégias que envolvem a utilização de diferentes esquemas e intensidades de doses de quimioterapia, muito tem se evoluído para identificação de terapias direcionadas às principais alterações moleculares e genéticas nos TFE. Embora se tenha identificado translocações, fusões e mutações presentes em estudos moleculares, de forma geral pouco se evoluiu em tratamentos efetivos para os TFE. A maioria dos estudos clínicos não tiveram resultados consistentes em termos de sobrevida global e muitos outros estão em andamento.

O receptor de insulina (IGFR-1R) está desregulado em função da translocação típica EWSR1–FLI1 em sarcomas de Ewing e inibidores desta via de sinalização foram os primeiros medicamentos importantes testados na clínica (van Maldegem, 2016). Os principais estudos clínicos com tratamentos anti-IGFR-1R mostraram que apenas uma minoria de pacientes tinha resposta clínica (Malempati S, 2012; Tap WD, 2012). E estudos combinando com inibidores da m-TOR também foram desapontantes (Schwartz GK, 2013; Wagner LM, 2015). Um estudo de fase III em combinação com quimioterapia aguarda resultados em breve (NCT02306161).

Instabilidade genômica e ativação de mecanismos de reparo celular tem sido alvo de estudos com inibidores da PARP em diversas neoplasias, inclusive em SE (Stewart E, 2014). Um estudo inicial com uso de olaparib não mostrou resultados encorajadores (Choy, E, 2014), contudo está em andamento um estudo clínico acessando a combinação de olaparib com irinotecano e temozolamida em doença refratária (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01858168>). Outras formas de tratamento em investigação incluem imunoterapia, EWS/FL1 repressão transcricional, anti-angiogênicos, inibidores da LSD1, entre outros (Sankar S 2014; Tawbi HA, 2017; Spurny C, 2018, Wagner L, 3013). Particularmente, inibidores sinalização por MET (cabozantinib) tem chamado atenção. Em pacientes com TFE, houve uma taxa de resposta em torno de 25% em estudo multicêntrico de fase 2 com 39 pacientes e novos estudos irão confirmar a eficácia desta estratégia (Italiano A, 2020).

De acordo com o site do National Cancer Institute (NCI), existem alguns estudos em andamento para o tratamento de doença recaída (ClinicalTrials.gov website). Entre eles destacam-se o estudo pediátrico MATCH, que inicialmente identifica as alterações moleculares específicas da amostra do tumor e posteriormente rastreia drogas em uso na rotina ou em desenvolvimento que apresentam potencial terapêutico para essa amostra (APEC1621, NCT03155620).

### **3.7 Experiência previa do Grupo Cooperativo**

Em outubro de 2003, com o apoio da Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica iniciou-se o primeiro estudo (Ewing 1) cooperativo para tratamento de pacientes com TFE, incluindo 14 dos principais centros no Brasil e o centro de Montevideu (Uruguai). Este estudo prospectivo tinha como objetivos: desenvolver um modelo de tratamento em nível nacional de forma que os centros participantes adotassem um programa terapêutico padrão e avaliar a factibilidade de um regime incorporando carboplatina ao esquema IE (ICE). O racional para incorporar carboplatina à combinação clássica de IE foi em função de que um percentual elevado de pacientes no Brasil já se apresenta ao diagnóstico com doença metastática ou com doença local avançada (Brunetto ,2015). Entre os pacientes com doença localizada fatores como tumores primários de grande volume, de localização axial ou pélvica, LDH elevada e resposta pobre à quimioterapia de indução, tendem a ter um pior prognóstico (Cotterill, 2000; Barbieri, 1990; Glaubiger, 1980; Bacci, 1985).

Considerando-se que no nosso meio os pacientes com doença localizada poderiam se beneficiar de um esquema mais intensivo (Grier, 2003; Marina, 1999) e que o esquema ICE ter-se mostrado efetivo em vários estudos prévios com pacientes com tumores recidivados/refratários (Cairo, 1995; Cairo, 2001; Abu-Ghosh, 2002; Kung, 1995; Loss 2004), o grupo optou por incorporar este esquema, pelo qual todos os pacientes recebiam 2 ciclos de ICE na fase de indução. Após tratamento local, os pacientes com doença localizada considerada de alto risco e aqueles com doença metastática ao diagnóstico recebiam 4 com ciclos adicionais de ICE. Foram incluídos 180 pacientes, dos quais aproximadamente 40% tinham doença metastática ao diagnóstico, confirmando a tendência de que em países em desenvolvimento, uma parcela maior de pacientes é diagnosticada com doença avançada.

A Sobrevida Geral (SG) entre os pacientes com doença localizada foi de 80% enquanto para o grupo de pacientes com metástases foi de 43%. Na análise multivariada foi observado que no grupo de pacientes com metástases, os fatores que apresentaram influência desfavorável foram o nível sérico de LDH duas vezes acima do nível normal e a presença de metástases extrapulmonares quando comparado com metástases de localização pulmonar. Embora a proposta de inclusão do regime ICE tenha se mostrado factível e os índices de sobrevida tenham sido considerados adequados, o estudo apresenta as limitações de não ter sido randomizado.

Embora a análise do nosso estudo anterior (EWING 1) tenha identificado que os resultados obtidos em pacientes com doença localizada não sejam inferiores ao descrito na literatura, é possível que o uso de ICE tenha sido benéfico para um subgrupo de pacientes e por outro lado represente um risco de toxicidade excessiva para pacientes de melhor prognóstico, para os quais o tratamento convencional sem carboplatina possa ser o mais adequado, especialmente para centros com menor condição de tratamento de suporte. Se considerarmos que a intensificação da quimioterapia tem mostrado em

diversos estudos ter um papel ainda insatisfatório para pacientes de alto risco, novos agentes e novos modelos são necessários para TFE (Rodriguez-Gallindo, 2004).

O estudo EWING2 iniciou recrutamento em 2011 e está finalizado para recrutamento. Após a apresentação dos resultados com acompanhamento de longo prazo e da eficácia da randomização, se definirá um novo protocolo nacional de atendimento, com o objetivo de ampliar ainda mais a participação para um maior número de hospitais públicos. O protocolo EWING2 Latino-Americano utiliza o esquema clássico do COG e adiciona terapia metronômica que se baseia na experiência do Hospital for Sick Children, Toronto, com vimblastina 1 mg/m<sup>2</sup>/dia 3 vezes por semana associado à Celecoxib 250 mg BID oral. A dose é mais alta do que em adultos, por diferenças na farmacocinética, com eliminação mais rápida nas crianças.

A terapia metronômica ou antiangiogênica tem sido apresentada como uma estratégia promissora para o tratamento de câncer, a qual está sendo extensivamente avaliada em inúmeras neoplasias utilizando diferentes agentes, incluindo etoposide em câncer de pulmão não de pequenas células (Kakolyris, 1998), taxol ou ciclofosfamida em câncer metastático de mama (Alvarez, 1998; Kura, 2000; Fidler 2000) e vimblastina em Linfoma de Hodgkin (Kakolyris, 1998).

O conceito que justifica o uso de terapia metronômica é o de que a exposição a baixas doses destes agentes ao longo do tratamento (ou após o término to tratamento Standard) produz respostas clínicas distintas daquelas produzidas pelo uso clássico intermitente de ciclos de drogas citotóxicas, tradicionalmente usado no tratamento de neoplasias malignas (Felgenhauer JL, 2012; Pramanik R, 2017). Isto pode ser devido ao fato de que os períodos de repouso entre os ciclos de quimioterapia a cada 3 semanas permitem que o compartimento celular endotelial de um tumor tenha oportunidade de reparar parte do dano causado pela quimioterapia. Este processo de reparo pode ser parcialmente inibido pelo uso de terapia metronômica. Por exemplo, o uso de vimblastina em doses baixas, destituídas de citotoxicidade endotelial, pode bloquear angiogênese in vitro e in vivo (Vacca, 1999; Brugieres, 1997; Bacci 2000), e assim ter um potencial de atividade com baixo risco de toxicidade.

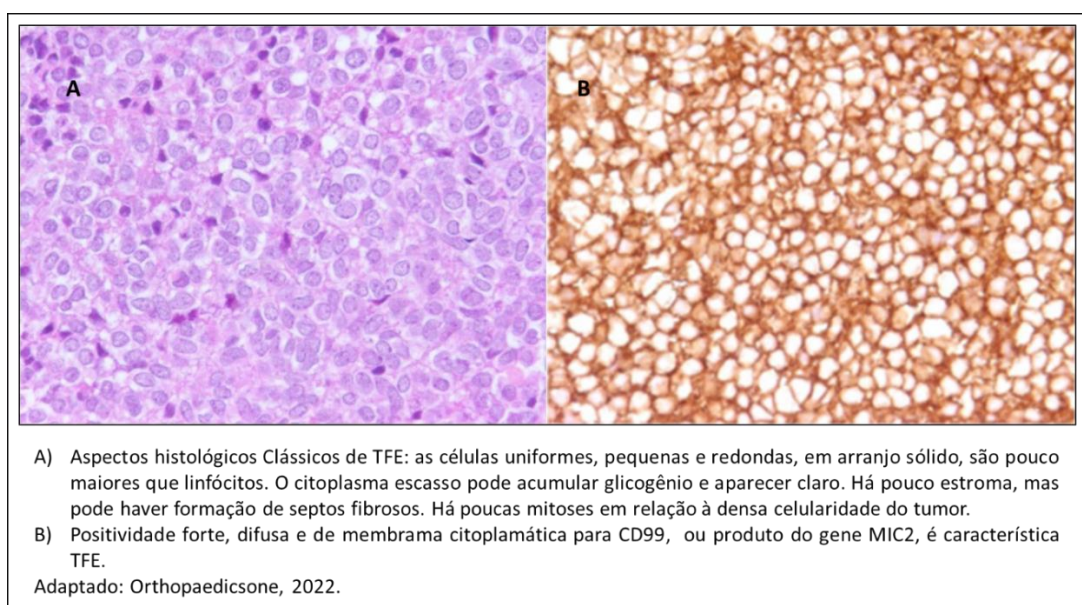
Os resultados do estudo EWING2 ainda não foram publicados na íntegra, contudo, análises estatísticas preliminares realizadas com ponto corte de inclusão em outubro de 2018 foram apresentados no Congresso da SIOP 2019 em Lyon, França. Foram apresentadas as análises dos pacientes de instituições da Argentina, Brasil, Chile e Uruguai com doença localizada (61%) e metastática (39%). Tratamento local com ressecção cirúrgica do tumor foi realizada em 49% dos pacientes, cirurgia combinada com a radioterapia em 29% e a radioterapia isolada em 22%. Entre os pacientes com doença localizada, a sobrevida global (SG) estimada 69,3%. Já em relação aos pacientes com doença avançada, embora nossa série tenha mostrado uma taxa mais alta de doença metastática, a SG em 5 anos foi semelhante às relatadas por grupos cooperativos em países de alta renda (35%). (Gregianin, L, 2019).

### 3.8 Patologia

Marcadores imunohistoquímicos, citogenética, genética molecular e cultura de tecidos demonstram que todos estes tumores são derivados da mesma célula tronco primordial. O marcador imunohistoquímico MIC2 (CD99) é uma proteína de superfície da membrana celular que se expressa na maioria dos TFE, sendo útil no diagnóstico diferencial dos chamados tumores de pequenas células azuis arredondadas. Deve-se ressaltar, entretanto, que a presença de MIC2 não é patognomônica de TFE, pois ela pode ser positiva em uma série de outros tumores, incluindo o sarcoma sinovial (Fisher C, 1998; Soslow RA, 1997).

Além do exame histopatológico convencional (HE; PAS), o protocolo realizado no estudo Latino-Americano recomenda o exame imunohistoquímico com a finalidade de confirmar o diagnóstico. O painel sugerido inclui desmina, actina músculo-específica e/ou miogenina e MyoD1, além de CD45, CD99 e citoqueratinas. Positividade para pelo menos dois marcadores de diferenciação neural é requerida no diagnóstico de PNET. Não é obrigatório e realização da avaliação da fusão de genes como inclusão no estudo, contudo recomendável nos centros que disponibilizam a técnica e naqueles pacientes com dúvidas diagnósticas ou exames de imuno-histoquímica inconclusivos.

FIGURA 1. ASPECTOS HISTOLÓGICOS DO SARCOMA EWING



Na histologia convencional os SE classicamente apresentam mínimas evidências de diferenciação enquanto os PNET mostram evidência de diferenciação neural. O grau de diferenciação neural não parece ter influência no prognóstico em alguns estudos, mas em outros os PNET apresentam algumas características distintas (Parham DM, 1999, Campbell K, 2018). Pacientes com SE eram mais propensos a ser do sexo masculino,  $\leq 18$  anos ao diagnóstico, brancos e hispânicos em comparação com pacientes com PNET.



Pacientes com PNET foram mais propensos a terem tumores primários de partes moles, e entre aqueles com tumores ósseos, uma menor taxa de tumores axiais ou pélvicos. Pacientes com PNET tiveram sobrevida de 5 anos significativamente pior em comparação com pacientes com ES, embora a diferença absoluta tenha sido pequena (51,3% versus 55,5%;  $p < 0,001$ ).

Pela técnica de PCR-RT pode-se identificar a presença dos genes de fusão EWS-FLI1 (tipo 1 e tipo 2) e EWS-ERG na maioria dos casos. Os pacientes com SEO e SEPM não metastático com EWS-FLI1 (tipo 1) apresentam um prognóstico mais favorável (Alava E, 1998). A presença de expressão aumentada da proteína p53 é uma característica prognóstica desfavorável, embora este achado tenha sido observado em um estudo com um número de pacientes relativamente pequeno (Parham DM, 1999; Abudu A, 1999). Vários estudos demonstraram que os pacientes com boa resposta à QT e especialmente quando a resposta histológica é favorável (índice de necrose  $>90\%$ ), apresentam uma SLE significativamente melhor quando comparado com os pacientes maus respondedores (Cotteril SJ, 2000; Paulussen M, 2001; Rosito P, 1999; Wunder JS, 1999; Oberlin O, 2001).

O SE é o exemplo prototípico de tumor pediátrico que apresenta uma alteração genética dominante, uma fusão gênica envolvendo o gene EWS gene e um gene da família ETS, tipicamente FLI-1 (Balamuth and Womer, 2010). O fator de transcrição aberrante que resulta da fusão, EWS-FLI1, altera o estado da cromatina para estabelecer um programa de expressão gênica que ativa oncogenes e reprime supressores tumorais (Riggi et al., 2014). Em aproximadamente 85% das translocações EWS-FLI1, a porção 5' do gene EWSR1 no cromossomo 22 é fusionada com a porção 3' do gene FLI1 no cromossomo 11. O tipo mais comum de fusão resulta na união do exon 7 de EWSR1 com o exon 6 de FLI1 (fusão tipo 1). Entretanto, vários breakpoints menos comuns entre os dois genes têm sido identificados. Além disso, cerca de 10% dos casos envolvem genes alternativos da família ETS como componentes 3' da translocação. Associações entre o tipo de fusão e o prognóstico foram relatadas nos anos 1990 a partir da análise de arquivos de tumores. Pacientes com fusão de tipo 1 apresentaram sobrevida global significativamente mais alta em comparação com outros tipos de fusão (Crompton et al., 2014; Lerman et al., 2015; Shukla et al., 2013).

Entre as condições benignas, a osteomielite pode ter uma apresentação similar aos TFE ósseos, determinando dor e hiperemia local, febre, comprometimento de partes moles e hiper captação do contraste no exame de cintilografia óssea. Entre as neoplasias que devem ser consideradas estão o osteossarcoma, condrossarcoma, histiocitoma fibroso maligno, metástases de neuroblastoma e linfoma primário de osso. A biópsia ou punção aspirativa é que determinará o diagnóstico. O exame de imuno-histoquímica e de dos transcritos de fusão gênica, aliado à história clínica e imagem permite ao patologista a melhor definição diagnóstica. O Protocolo Latino-Americano, através de parceria com o

ICI, permite revisão central das lâminas de parafina sob solicitação e discussão dos casos com especialista caso haja dúvidas diagnósticas.

Tabela 3. PROTOCOLO ANÁTOMO-PATOLÓGICO EWING 2.

<p>Material de Biópsia Macroscopia: manusear com cuidado para evitar artefatos e fixar em formalina 10%. Conservar uma amostra de tecido fresco para estudos moleculares. Microscopia: além do exame histopatológico convencional (HE; PAS) deverá ser realizado estudo imunohistoquímico com a finalidade de confirmar o diagnóstico. O painel sugerido inclui desmina, actina músculo-específica e/ou miogenina e MyoD1, além de CD45, CD99 e citoqueratinas. Positividade para pelo menos dois marcadores de diferenciação neural é requerida no diagnóstico de PNET. 1 2.</p>
<p>Material de Ressecção Cirúrgica Macroscopia: as margens cirúrgicas deverão ser marcadas com nanquim. Margens adequadas serão consideradas aquelas que distarem pelo menos 2,0 mm do plano da fáscia, 5,0 mm de outros planos de tecidos moles e 1,0 cm da margem óssea. 2,3 Uma secção longitudinal deverá ser realizada no maior eixo da lesão, acompanhada de descrição macroscópica convencional com menção a medidas da peça, da lesão e se há tecido viável macroscopicamente identificável. Microscopia: além do exame histopatológico convencional (HE; PAS) deverá ser realizado estudo imunohistoquímico.</p>

A avaliação histopatológica da resposta terapêutica (necrose tumoral induzida pela QT) essencialmente, existem dois diferentes métodos de avaliação histológica da resposta do sarcoma de Ewing à quimioterapia neoadjuvante. Ambos, apesar de apresentarem potenciais falhas de avaliação pela natureza da sua técnica, estão bem estabelecidos na literatura científica e podem ser aplicados indistintamente.

O primeiro, descrito por Huvos (Fletcher, 2000; wunder, 1998) , é baseado em seu método para avaliar espécimes de ressecção de osteossarcoma. De uma forma semiquantitativa, a avaliação histológica é efetuada por graduação da extensão da necrose em relação à percentagem de tumor viável residual.

O método proposto por Picchi et al (Picci , 1993), em vez de estimar a quantidade de tumor não viável (necrose), avalia a quantidade de tumor viável remanescente. Ambos os métodos de graduação histológica se mostram muito eficazes na avaliação da resposta ao tratamento do sarcoma de Ewing, sendo que a extensão da necrose, ou da quantidade de tumor viável, tem correlação direta com a sobrevida.

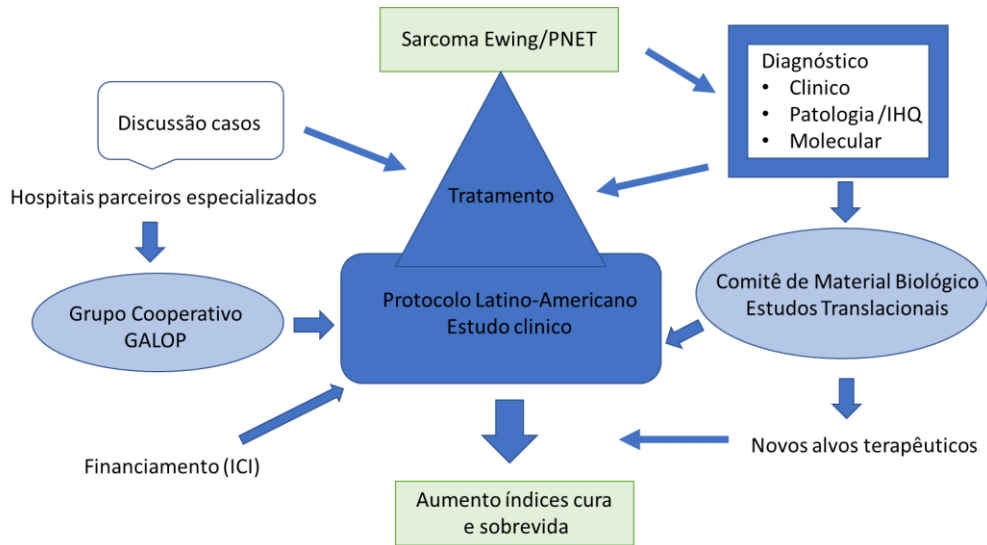
Tabela 4: RESPOSTA PATOLÓGICA DE INDUÇÃO À QUIMIOTERAPIA.

<b>Huvos</b>
Grau 1: pouca ou nenhuma evidência microscópica de necrose tumoral Grau 2: necrose tumoral entre 50% e 90% Grau 3: necrose tumoral 90% e 99% Grau 4: 100% de necrose tumoral
<b>Picchi</b>
Grau 1: presença de pelo menos 1 nódulo residual macroscópico* de tumor viável. *Individual macroscopic nodules are defined as those that are larger than one 10x magnification field, or as scattered microscopic nodules that individually are smaller than one 10x magnification field but that collectively are larger than one 10x magnification field Grau 2: presença de focos microscópicos isolados* de tumor viável. 49 *smaller than the size of a 10x magnification field Grau 3: ausência de células tumorais viáveis no exame microscópico.

Independentemente do método utilizado, é fundamental uma análise macroscópica e microscópica meticulosa. O espécime deve ser seccionado no seu maior diâmetro e as margens pintadas. Uma das faces, produto da secção, deve ser incluída totalmente. Na face oposta deve ser amostrada a massa tumoral residual. Áreas como partes moles, espaço subperiosteal e área de hemorragia devem ser amostrados, pois são sítios frequentes de neoplasia residual.

#### 4. MARCO CONCEITUAL

FIGURA 2. MARCO CONCEITUAL



#### 5. JUSTIFICATIVA

Ampliar o conhecimento a respeito de perfil molecular e clínico em tumores da família Ewing de pacientes brasileiros e sul-americanos é fundamental para permitir a identificação de novos biomarcadores e alvos terapêuticos. Essas informações podem também ajudar a definir subpopulações de pacientes com tumores de diferentes perfis biológicos, selecionando marcadores de risco e identificando pacientes com doença mais agressiva e que necessitam tratamento mais intensificado. Pouco se conhece sobre o perfil epidemiológico dos pacientes atendido em nossas instituições e pouco se reporta como a maioria dos centros fazem o diagnóstico imuno-histoquímico dos pacientes no contexto de saúde pública, contribuindo assim para o entendimento da doença na América Latina.

## **6. OBJETIVO GERAL**

Investigar as características e os marcadores de diferentes tipos celulares de tumores de pacientes brasileiros e sul-americanos da família Ewing.

### **Objetivos Específicos**

- Descrever Perfil Epidemiológico e características clínicas
- Descrever padrão de avaliação imuno-histoquímica
- Avaliar curvas de sobrevida livre de eventos/progressão ou sobrevida global da amostra
- Avaliar possíveis associações prognósticas com as características clínico-patológicas dos pacientes em relação aos principais desfechos clínicos.

7. ARTIGO- submetido

**Clinical and pathological characteristics of patients treated in the Ewing's Sarcoma Latin American Protocol.**

*Brunetto AT<sup>1</sup>, Gregianin L<sup>1,2</sup>, Rose A<sup>3</sup>, Vilaroel M<sup>4</sup>, Dufort G<sup>5</sup>, Sinigaglia M<sup>1</sup>, de Farias CB<sup>1</sup>, Roesler R<sup>6,7</sup>, On behalf of the Brazilian Collaborative Study Group of Ewing Family of Tumors EWING2.*

**Affiliations:**

1. Rafael Koff Acordi Research Center, Children's Cancer Institute, Porto Alegre, RS, 90620-110, Brazil.
2. Pediatric Oncology Service, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.
3. Hospital de Pediatria S.A.M.I.C. - Prof. Dr. Juan P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina;
4. Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, Santiago, Chile; Hospital Exequiel González Cortés, Santiago, Chile.
5. Centro Hospitalario Pereira Rossell, Montevideo, Uruguay.
6. Cancer and Neurobiology Laboratory, Experimental Research Center, Clinical Hospital (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.
7. Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), Porto Alegre, RS, 90050-170, Brazil.

**Correspondence:** Rafael Roesler. Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Telephone: +5551 33083183; fax: +5551 33083121. rafaelloesler@hcpa.edu.br.

**Conflicts of Interest:** the authors declare no conflicts of interest.

**Acknowledgments:** This research was supported by the PRONON/Ministry of Health, Brazil; the Rafael Koff Acordi Research Center, Children's Cancer Institute (ICI); the Clinical Hospital institutional research fund (FIPE/HCPA).

**Key words:** RNA-Binding Protein EWS; Sarcoma, Ewing; Neuroectodermal Tumors, Primitive; Immunohistochemistry; Pathology; Prognosis, Clinical Studies.

**Abstract:**

*Introduction:* Ewing's Sarcoma (ES) and Peripheral Neuroectodermal Tumor (PNET) are small, round, blue cell tumors of childhood and adolescence, that present a reciprocal chromosomal translocation between chromosomes 11 and 22 in 85% of cases and immunohistochemistry with expression of the surface glycoprotein CD99, in common. Diagnosis may be challenging and requires an experienced pathologist in bone tumors and pediatric malignancies.

*Methods:* The Latin American Cooperative Group on Ewing's Sarcoma current study, Ewing II, was designed to determine the efficacy and safety of an interval compressed-chemotherapy regimen and the incorporation of metronomic chemotherapy for patients with newly diagnosed ES. Pathology reports from all centers with immunohistochemistry and EWS translocations were retrieved from medical records retrospectively and are described in detail, along with baseline demographics and survival data.

*Results:* 400 patients in 34 centers with full pathology reports were analyzed. EWS translocation was done in 20% patients (87/400). Argentina seems to be able to provide the genetic confirmation for ES as a routine in at least 40% of patients, while centers in Brazil, Chile and Uruguay only request when the diagnosis is challenging. NKX2-2 was done in 61 patients (15.25%) and was positive in 95% of cases. A total 7,5% patients were diagnosed with PNET. The most frequent muscular differentiation markers were desmin and miogenin. Synaptophysin seems to be the most frequent neural marker, along with LCA/CD45 and TdT as lymphoid markers. Epithelial differential markers were not commonly requested but were positive in around 10% cases. KI67 was analyzed in less than 20% of patients and the majority presented with a high index (>30%).

*Conclusion:* Implementation of a multi-institutional protocol was feasible and resulted in outcomes that are comparable to those of groups in high-income countries. Only a minority of patients perform molecular testing and broad panel immunohistochemistry due to limited resources. Further collaboration is underway to standardize pathological diagnosis and molecular testing.

## 1. Introduction

Ewing's Sarcoma (ES) and Peripheral Neuroectodermal Tumor (PNET) are small, round, blue cell tumors of childhood and adolescence, with aggressive clinical behavior. They consistently present a reciprocal chromosomal translocation between chromosomes 11 and 22, t(11;22) (q24;q12) in 85% of cases and immunohistochemistry with expression of the surface glycoprotein CD99, in common [1-4]. Diagnosis may be challenging and requires an experienced pathologist in bone tumors and pediatric malignancies.

ES usually primarily involves bone and often extends to nearby soft tissue while PNET is more commonly a soft tissue tumor. Standard treatment consists of induction chemotherapy, local treatment with surgery and/or radiotherapy and consolidation chemotherapy. With current multimodal approach, the 5-year survival rate for localized ES is about 65% with chemotherapy regimens; while for those patients with disseminated disease the prognosis remains very poor, of around 30% in most studies [5-9]. In pediatric oncology, patients treated within referral centers have their chances of cure improved and should be encouraged to participate in clinical trials [10].

The Latin American Cooperative Group on Ewing's Sarcoma was organized nearly two decades ago [11-12] to standardize treatment in the main centers of Brazil, Argentina, Chile and Uruguay. The current study, Ewing II, was designed to determine the efficacy and safety of an interval compressed-chemotherapy regimen alternating VDC (vincristine, doxorubicin, cyclofosfamide) with IE (ifosfamide, etoposide), and the incorporation of metronomic chemotherapy (MCT) for patients with newly diagnosed ES.

So far, we identified a particularly high number of patients with metastatic disease (approximately 40%) at diagnosis, when compared with reference institutions in the USA and Europe (20-25%) [1,12,13]. The high incidence of advanced disease may reflect the association of multiple factors related to access and efficiency of the health system but may also involve biological particularities in our population. As a result, the Scientific Committee for Biological Studies in Ewing Sarcoma was recently created. The first step of this partnership is to identify the clinicopathological characteristics of patients treated in Latin American protocol, in addition to exploring prognostic variables. Further work will be done exploring genetics combined with bioinformatic tools.

This study describes how the main centers in South America diagnose ES, contributes to the epidemiological understanding of the disease and will be important to define the next steps for the development of the translational components of the following multicenter study. Full clinical trial results with randomization will be presented elsewhere.

## 2. Methods

### 2.1 Eligibility Criteria

The study was open in Argentina, Brazil, Chile and Uruguay pediatric cancer centers familiarized with the multimodal approach required to treat patients with ES. Patients aged 0-40 years-old with the histological confirmation of extracranial localized and metastatic ES/PNET were eligible for the study.

Pathology reports from all centers with immunohistochemistry and EWS translocations were retrieved from medical records retrospectively. In addition to the conventional histopathological examination (HE; PAS), the protocol performed in the Latin American study recommends the



immunohistochemical examination to confirm the diagnosis. The suggested panel includes desmin, muscle-specific actin and/or myogenin and MyoD1, in addition to CD45, CD99 and cytokeratins. Positivity for at least two markers of neural differentiation is required in the diagnosis of PNET. Due to limited resources in middle and low-income countries, it was not mandatory to carry out the evaluation of gene fusion as inclusion in the study, however it was recommended if available and in those patients with diagnostic doubts or inconclusive immunohistochemistry tests. Patients without full immunohistochemistry results were excluded from this analysis. Patients negative for CD99 without confirmation of EWS translocation were also excluded.

Institutional Ethical Review Board approval was obtained at all participating institutions prior to study activation, and all patients or their guardians signed an informed consent form prior to enrollment. This Protocol was registered in the Brazilian Register of Clinical Trials (REBEC, U1111-1208-1762).

### *2.2 Patient Enrollment and Tumor Evaluation*

Complete clinical evaluation, including presenting symptoms related to ES, was documented. Intensity and duration of pain, weight loss, palpable mass, and fever prior to diagnosis were evaluated according to the National Cancer Institute Clinical Toxicity Criteria and Adverse Event (NCI CTCAE version 3.0) grading system. The initial tumor evaluation and staging included magnetic resonance imaging and/or computed tomography scans of the primary site, chest computed tomography, radionuclide bone scan, and bone marrow aspirate/biopsy. Fluorine-18-fluorodeoxyglucose (FDG) positron emission tomography (PET) was optional.

Localized tumor was defined as restricted to the primary site, but also allowing for continuous extension into adjacent soft tissue or regional lymph node involvement and ipsilateral pleural effusion [14]. Tumor response was documented after the sixth cycle of chemotherapy and at the end of treatment. Toxicity was assessed after each course of chemotherapy and documented according to the NCI CTCAE version 3.0 grading system [15].

### *2.3 Treatment Design and Regimen*

The protocol was designed considering four steps: induction chemotherapy, local control, adjuvant chemotherapy (consolidation), and MCT. The induction phase consisted of six cycles of chemotherapy delivered at 14-days-interval (interval compression), alternating VDC with IE drugs combinations, followed by surgery and/or radiotherapy as local treatment. The adjuvant phase consisted of 8 courses of same drugs combinations but at 21 days-interval between cycles (standard interval). After last cycle of adjuvant, patients were randomized to receive or not MCT. Patients with metastatic disease were all recommended to receive MCT which consisted in oral cyclophosphamide (25 mg/m<sup>2</sup>/day, continuously) and intravenous vinblastine (3 mg/m<sup>2</sup>, weekly), for 1 year.

Tumor response was assessed by imaging methods and evaluated according to RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) [16]. In some circumstances, a biopsy of the residual mass was performed per institutional guidelines after radiation therapy to further assess histological response. In cases with upfront resection the response assessment was utilized to indicate disease progression only. Histological response to chemotherapy was evaluated according to the Bacci's criteria or the necrosis index method [17].

## 2.4 Statistical Considerations

Patient's characteristics, response to treatment and toxicity were reported by descriptive statistics. Quantitative variables were described by mean, standard deviation, and range. Categorical variables were described by absolute and relative frequencies. To compare means between groups, the Student's t test was applied. In case values were non-parametric, the Mann-Whitney test was used. Univariate analysis of event-free survival (EFS) and overall survival (OS) according to prognostic factors was performed using the Log-rank test [18]. Survival curves were estimated by the Kaplan-Meier method with a 95% confidence interval, and multivariate analysis was performed by Cox-regression [19]. A multivariate analysis using the Cox model was applied on the prognostic factors if values of  $P < 0.2$  were obtained on the univariate analysis. EFS was defined as the time interval from diagnosis to the occurrence of relapse, progressive disease, secondary malignancy, death, or loss of follow-up, whichever occurred first. Patients who did not experience any of these events were considered censored at the date of last follow up. Statistical analysis was performed using SPSS software version 20.0.

## 3. Results

### 3.1 Demographics

From August 2011 to August 2019, 315 patients (59.7% males) from 31 institutions with the diagnosis of ES were included for follow-up and survival analysis. A total of 400 patients were included for full pathology reports with cut-off August 2020. The median age at diagnosis was 10.72 years (range 0.02 to 32.85 years). Lower limbs were the most frequent primary tumor site (28.3%), followed by chest (21.9%), pelvis (16.8%), vertebrae (12.1%), upper limbs (9.8%) and head and neck (9.8%), and abdomen (1.3%).

The protocol recommended tumor response evaluation after induction. The evaluation was performed in 308 patients. Overall response rate was 82.5% (CR 18.8%, PR 63.6%), while 10 patients (3.3%) had progressive disease (PD). Local control information was available for 251 patients. Surgical tumor resection was performed in 160 (50.8%) patients, surgery in combination with radiation in 71 (28%) patients, and radiation alone in 51 (21%) patients. Two-hundred patients (80%) underwent conservative surgery, and amputation was performed in 14 cases (5.6%), one of which occurred at diagnosis. Analysis of histological response to preoperative chemotherapy according to Necrosis Index (NI) criteria was determined in 123 patients, and the distribution showed that 54.5% and 45.5% had NI  $< 99\%$  and  $100\%$ , respectively.

### 3.2 Pathology

Table 01 shows the absolute numbers for all 400 patients included in this analysis. Figure 01 shows the main results for pathology/immunohistochemistry as a percentage of the markers utilized in each country. A minority of patients in South America confirm EWS translocation (87/400; around 20%). Argentina seems to be able to provide the genetic confirmation for ES as a routine in at least 40% of patients, while centers in Brazil, Chile and Uruguay only request when diagnosis is difficult. Here we show the results for more than 34 centers across all four countries and the most common immunohistochemical markers analyzed. Markers representative of less than 4% were not shown in this table.

Six patients did not have positivity for CD99, but all had confirmation of the EWS translocation and typical clinical and pathological features for ES. NKX2-2 was done in 61 patients (15.25%) and was positive in 95% of cases. A total of 31 (7.5%) patients were diagnosed with PNET by protocol definition (at least 2 positive neural markers). The most frequent muscular differentiation markers were desmin and myogenin. Synaptophysin seems to be the most frequent neural marker, along with LCA/CD45 and TdT as lymphoid markers. Epithelial differential markers were not commonly requested as recommended by protocol guidelines but were positive in around 10% cases. NB84-a and WT-1 were frequently selected in broad spectrum panels to help as differential diagnosis with neuroblastoma and Wilms tumor. The variances may reflect the choice of markers in each pathology unit and within National Health System budgets for each country. KI67 was analyzed in less than 20% of patients (n= 82/400 patients, data not shown) and the majority presented with a high index (>30%).

#### **4. Discussion**

Thirty-four cancer centers in Argentina, Brazil, Chile, and Uruguay were invited to participate in this trial based on the presence and qualifications of health care professionals with expertise in pediatric oncology, including pediatric oncology specialists, surgeons, pathologists, radiotherapists, nurses, and in hospital facilities. Here we present the results from 400 patients that we were able to retrieve full pathology reports. The results of randomization and toxicity will be published elsewhere.

We observed a predominance of male patients, age-range distribution shows few patients older than 18 years since the institutions are mostly pediatrics. Distribution according to anatomical site showed axial as the most frequent location followed by extremities and pelvic, predominance of bone as primary site. Local pain was the most frequent initial symptom present, and fever and weight loss were observed in minority of patients. CT delivered at interval-compression with addition of myeloid factor support during induction phase and consolidation MCT was feasible. Our outcome data are in general consistent with most large cooperative group studies [6,20-22]. The slightly inferior outcomes in our study are probably related to the higher proportion of patients with locally advanced disease, which in turn may reflect the higher disease burden in our population. Prognostic factors for outcome were validated in our cohort, correlating to what has been previously reported [6,12,22,23].

Diagnosis of ES may be challenging and immunohistochemical markers, cytogenetics, molecular genetics, and tissue culture demonstrate that all these tumors are derived from the same primordial stem cell. In addition to the conventional histopathological examination, the protocol recommends the immunohistochemical panel including desmin, muscle-specific actin and/or myogenin and MyoD1, in addition to CD45, CD99 and cytokeratins. Positivity for at least two markers of neural differentiation is required in the diagnosis of PNET.

The immunohistochemical marker MIC2 (CD99) is a cell membrane surface protein that is expressed in most EFTs, being very and useful in the differential diagnosis of so-called small round blue cell tumors [24,25]. It should be noted, however, that the presence of MIC2 is not pathognomonic of EFT, as it can be positive in a few other tumors, including synovial sarcoma [26,27]. Patients negative for CD99 and no confirmation of EWS translocation were excluded from this analysis. Although CD99 is very sensitive for the diagnosis of ES, it may not be specific for ES. Many specific markers have been proposed such as FLI-1 but with some limitation because around 15% of tumors have distinct EWS translocations and some other soft tissue sarcomas and hematological malignancies may be positive [24] FLI1 is normally expressed in endothelial cells and hematopoietic cells, including T lymphocytes.

Nkx-2.2 has emerged a potential novel marker for ES and has been requested in 15% of patients that participated in the protocol. It is highly sensitive but only moderately specific marker for ES. Neuroendocrine neoplasms display variable NKX2.2 expression and remain a significant potential diagnostic drawback. Thus, NKX2.2 expression should be interpreted in the context of an appropriate immunohistochemical panel and clinical presentation [28-30]. Further validation in prospective validated studies is warranted.

ERG is expressed not only in ESFT bearing the ERG rearrangement but also in a wide variety of tumors, including angiosarcomas, prostate carcinoma, myeloid sarcomas, and epithelioid sarcomas. For this reason, specificity for ERG staining in sarcomas should be considered with caution [32]. Only 14 (3.5%) patients were testes for ERG with 12/14 (data not shown). In ESFT, CAV-1 (caveolin) is a key determinant of tumorigenicity, which implies that it may be a molecular target for new therapeutic strategies and may be overexpressed in a high proportion of ESFTs. Although not requested at all in our cohort, when used in conjunction with other markers may increase specificity but further validation is necessary [33].

Through bioinformatics analysis our group has discovered that a gene called PAX7 functions as a master regulator of Ewing's Sarcoma. Furthermore, this gene can be used as a diagnostic and aggressive tumor prognostic marker [34]. Through immunohistochemical analysis of Ewing's Sarcoma biopsies, recently colleagues have demonstrated that the absence of PAX7 expression was associated with a worse survival. In addition, they highlight the importance of adding the PAX7 marker in the list of markers used for diagnosis of Ewing's Sarcoma [30]. Additionally, PAX7 was expressed in 27 of 30 Ewing sarcomas (90%), mainly in a diffuse and strong manner. Although NKX2-2 showed similar sensitivity, PAX7 showed more extensive and strong reactivity [35]. We intend to validate retrospectively PAX7 in a large cohort of ES patients through the Scientific Committee for Biological Studies of the Latin American Protocol.

In conventional histology, SEs classically show minimal evidence of differentiation while PNETs show evidence of neural differentiation. The degree of neural differentiation does not seem to influence prognosis in some studies, but in others PNETs have some distinct characteristics. Patients with SE were more likely to be male,  $\leq 18$  years at diagnosis, white, and Hispanic compared with patients with PNET. Patients with PNET were more likely to have primary soft tissue tumors, and among those with bone tumors, a lower rate of axial or pelvic tumors [36,37]. This cohort may have underdiagnosed patients with PNET tumors (7.5%) as not all had complete neural or neuroendocrine markers evaluated, ratio seem to be around 10-20 in most series [36].

By the PCR-RT technique, the presence of EWS-FLI1 (type 1 and type 2) and EWS-ERG fusion genes can be identified in most cases. Patients with SEO and non-metastatic SEPM with EWS-FLI1 (type 1) have a more favorable prognosis [38]. The presence of increased expression of the p53 protein is an unfavorable prognostic feature, although this finding was observed in a study with a relatively small number of patients [37,39]. Several studies have shown that patients with a good response to QT, and especially when the histological response is favorable (necrosis index  $>90\%$ ), have a significantly better SLE when compared to poor responders [22,40-43].

Ewing's sarcoma is the prototypical example of a pediatric tumor that presents a dominant genetic alteration, a gene fusion involving the EWS gene and an ETS family gene, typically FLI-1 [44]. The aberrant transcription factor that results from the fusion, EWS-FLI1, alters the state of chromatin to establish a gene expression program that activates oncogenes and represses tumor suppressors [45]. In approximately 85% of EWS-FLI1 translocations, the 5' portion of the EWSR1 gene on chromosome 22 is fused with the 3' portion of the FLI1 gene on chromosome 11. The most

common type of fusion results in the union of exon 7 of EWSR1 with the exon 6 of FLI1 (type 1 fusion). However, several fewer common breakpoints between the two genes have been identified. In addition, about 10% of cases involve alternative genes from the ETS family as 3' components of the translocation. Associations between fusion type and prognosis were reported in the 1990s from the analysis of tumor files. Patients with type 1 fusion had significantly higher overall survival compared with other types of fusion [46-48].

It is not mandatory to carry out the evaluation of gene fusion as inclusion criteria in the study, however it is recommended in centers that provide the technique and in those patients with diagnostic doubts or inconclusive immunohistochemistry tests. Unfortunately, only 87 patients (20%) had molecular confirmation of the classical EWS-FLI-1 translocation by FISH or PCR. Only 3/87 patients evaluated distinct fusion transcripts, mainly 3WSR1 deletion, EWS-SYT, and EWS-ERG. This reflects the health care barriers in low-income countries.

We are aware that this analysis has many limitations that include no central pathology review, bias from many different pathologists and technical discrepancies, low number of patients that have undergone molecular classification and this may reflect an inaccurate sample with possible misdiagnosis. Among the neoplasms that should be considered are osteosarcoma, chondrosarcoma, malignant fibrous histiocytoma, neuroblastoma metastases, and primary bone lymphoma. Immunohistochemistry and gene fusion transcripts, combined with clinical history and imaging, allowed the pathologist and clinician to provide the best diagnostic possible definition [1,13,23,36]

For the upcoming Latin American Protocol, through a partnership with the ICI, the cooperative trial will allow for a central review of paraffin slides with molecular testing and discussion of cases with a specialist in case of diagnostic doubts to assure accurate diagnosis and classification. We aim to characterize fusion transcripts in South American Ewing tumors by fluorescence in situ hybridization (FISH), reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), microarrays and sequencing, and explore their relationships with clinical features.

## References

1. Bernstein M, Kovar h, Paululussen M, et al. Ewing Sarcoma Famile of Tumors: Ewing Sarcoma of Bone and Soft Tissue and the Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumors; in Pizzo P, Poplack D: Principles and Practice of Pediatric Oncology. Fifth Edition. Lippincot Williams and Wilkins, 2006.
2. Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T: Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma. *N Engl J Med* 311:584-585,1984.
3. Mc Keon C, Thiele CJ, Ross RA, et al: Indistinguishable pattern of protooncogene expression in two distinct but closely related tumors: Ewing´s sarcoma and neuroepithelioma. *Cancer Res* 48:4307-4311, 1998.
4. Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer- Kuntschik M: MIC2 Is a Specific Marker for Ewing´s Sarcoma and Peripheral Neuroectodermal Tumors. *Cancer* 67: 1886-1893,1991.
5. Anderton J, Moroz V, Marec-Bérard P, Gaspar N, Laurence V, Martín-Broto J, Sastre A, Gelderblom H, Owens C, Kaiser S, Fernández-Pinto M, Fenwick N, Evans A, Strauss S, Whelan J, Wheatley K, Brennan B. International randomised controlled trial for the treatment of newly diagnosed EWING sarcoma family of tumours - EURO EWING 2012 Protocol. *Trials*. 2020 Jan 17;21(1):96.
6. Chin M, Yokoyama R, Sumi M, Okita H, Kawai A, Hosono A, Koga Y, Sano H, Watanabe H, Ozaki T, Mugishima H; Japan Ewing Sarcoma Study Group (JESS). Multimodal treatment including standard chemotherapy with e, vincristine, doxorubicin,cyclophosphamide, ifosfamide, and etoposide for the Ewing sarcoma family of tumors in Japan: Results of the Japan Ewing Sarcoma Study 04. *Pediatr Blood Cancer*. 2020 May;67(5):e28194. doi: 10.1002/pbc.28194.
7. Leavey PJ, Laack NN, Krailo MD, Buxton A, Randall RL, DuBois SG, Reed DR, Grier HE, Hawkins DS, Pawel B, Nadel H, Womer RB, Letson GD, Bernstein M, Brown K, Maciej A, Chuba P, Ahmed AA, Indelicato DJ, Wang D, Marina N, Gorlick R, Janeway KA, Mascarenhas L. Phase III Trial Adding Vincristine-Topotecan-Cyclophosphamide to the Initial Treatment of Patients With Nonmetastatic Ewing Sarcoma: A Children's Oncology Group Report. *J Clin Oncol*. 2021 Dec 20;39(36):4029-4038.
8. Mora J, Castañeda A, Perez-Jaume S, Lopez-Pousa A, Maradiegue E, Valverde C, Martin-Broto J, Garcia Del Muro X, Cruz O, Cruz J, Martinez-Trufero J, Maurel J, Vaz MA, de Alava E, de Torres C. GEIS-21: a multicentric phase II study of intensive chemotherapy including gemcitabine and docetaxel for the treatment of Ewing sarcoma of children and adults: a report from the Spanish sarcoma group (GEIS). *Br J Cancer*. 2017 Sep 5;117(6):767-774.

9. Womer RB, West DC, Krailo MD, Dickman PS, Pawel BR, Grier HE, Marcus K, Sailer S, Healey JH, Dormans JP, Weiss AR. Randomized controlled trial of interval-compressed chemotherapy for the treatment of localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2012 Nov 20;30(33):4148-54.
10. Arancibia AM, De Farias CB, Brunetto AL, Roesler R, Gregianin LJ. The effect of hospital care volume on overall survival of children with cancer in Southern Brazil. *Pediatr Blood Cancer*. 2021 Mar;68(3):e28779.
11. Gregianin L, Rose A, Villarroel M, Ferman S, Almeida MT, Dufort G, Salgado C, G. Cea, Lastra L, Costa Neves do Amaral A, Epelman S, de Almeida SelistreS, de Sá Rodrigues KE, Cerutti Santos JF, Guimarães Pinto L, Brunetto AL. FP020 SIOP19-1738 Multicentric Study of Interval-Compressed Multiagent and Randomized Metronomic Chemotherapy for Patients with Localized Ewing Sarcoma: Results of the Latin American Pediatric Oncology Group Trial. [<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/psc.27989>].
12. Brunetto AL, Castillo LA, Petrilli AS, Macedo CD, Boldrini E, Costa C, Almeida MT, Kirst D, Rodriguez-Galindo C, Pereira WV, Watanabe FM, Pizza M, Benites E, Morais V, Gadelha A, Nakasato A, Abujamra AL, Gregianin LJ; Brazilian Collaborative On behalf of the Brazilian Collaborative Study Group of Ewing Family of Tumors EWING1 and the Brazilian Society of Pediatric Oncology SOBOPE. Carboplatin in the treatment of Ewing sarcoma: Results of the first Brazilian collaborative study group for Ewing sarcoma family tumors- EWING1. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Oct;62(10):1747-53.
13. Esiashvili N, Goodman M. Marcus RB Jr. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results Data. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30:425–430.
14. Meyer JS, Nadel HR, Marina N, Womer RB, Brown KL, Eary JF, Gorlick R, Grier HE, Randall RL, Lawlor ER, Lessnick SL, Schomberg PJ, Krailo MD. Imaging guidelines for children with Ewing sarcoma and osteosarcoma: A report from the Children's Oncology Group Bone Tumor Committee. *Pediatr Blood Cancer* 2008;51:163–170.
15. CTEP, Cancer Therapy Evaluation Program, Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.0, DCTD, NCI, NIH, DHHS, March 31, 2003; <http://ctep.cancer.gov>, accessed Sep 14 2020.
16. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *J Eur J Cancer*. 2009
17. Boriani S, Biagini R, DeIure F, Bandiera S, Di Fiore M, Bandello L, Malaguti MC, Picci P, Bacchi P. A good response to induction chemotherapy in Ewing/PNET tumors evaluated by imaging correlates both histological necrosis and survival. *An Italian Sarcoma*

- Group/Scandinavian Sarcoma Group Study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999;18:556. (Abstr 2145).
18. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:163–170.
  19. Kaplan EL, Meyer P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457–481.
  20. Rodriguez-Galindo C, Liu T, Krasin MJ, Wu J, Billups CA, Daw NC, Spunt SL, Rao BN, Santana VM, Navid F. Analysis of prognostic factors in Ewing sarcoma family of tumors: Review of St. Jude Children’s Research Hospital studies. *Cancer* 2007;110:375–384.
  21. mGrier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, Link MP, Fryer CJ, Pritchard DJ, Gebhardt MC, Dickman PS, Perlman EJ, Meyers PA, Donaldson SS, Moore S, Rausen AR, Vietti TJ, Miser JS. 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.
  22. Wunder JS, Paulian G, Huvos AG, Heller G, Meyers PA, Healey JH. The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:1020–1033.
  23. Friedrich P, Ortiz R, Fuentes S, Gamboa Y, Ah Chu-Sanchez MS, Arambu IC, Montero M, Baez F, Rodriguez-Galindo C, Antillon-Klussmann F. Barriers to effective treatment of pediatric solid tumors in middle-income countries: Can we make sense of the spectrum of nonbiologic factors that influence outcomes?. *Cancer* 2014;120:112–125.
  24. Baldauf, M.C.; Orth, M.F.; Dallmayer, M.; Marchetto, A.; Gerke, J.S.; Rubio, R.A.; Kiran, M.M.; Musa, J.; Knott, M.M.L.; Ohmura, S.; et al. Robust diagnosis of Ewing sarcoma by immunohistochemical detection of super-enhancer-driven EWSR1-ETS targets. *Oncotarget* 2018, 9, 1587–1601.
  25. Hornick, J.L. Novel uses of immunohistochemistry in the diagnosis and classification of soft tissue tumors. *Mod. Pathol.* 2014, 27 (Suppl. 1), S47–S63. [CrossRef] 73. Llombart-Bosch, A.; Machado, I.; Navarro, S.; Bertoni, F.; Bacchini, P.; Alberghini, M.; Karzeladze, A.; Savelov, N.; Petrov, S.; Alvarado-Cabrero, I.; et al. Histological heterogeneity of Ewing’s sarcoma/PNET: An immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *Virchows Arch.* 2009, 455, 397–411.
  26. Fisher C: Synovial sarcoma. *Ann Diagn Pathol* 1998;2(6): 401-21.
  27. Soslow RA, Bhargava V, Warnke RA: MIC2, TdT, bcl-2, and CD34 expression in paraffin-embedded high-grade lymphoma/acute lymphoblastic leukemia distinguishes between distinct clinicopathologic entities. *Hum Pathol* 1997;28(10): 1158-65.
  28. Russell-Goldman E, Hornick JL, Qian X, Jo VY. NKX2.2 immunohistochemistry in the distinction of Ewing sarcoma from cytomorphic mimics: Diagnostic utility and pitfalls. *Cancer Cytopathol.* 2018 Nov;126(11):942-949.



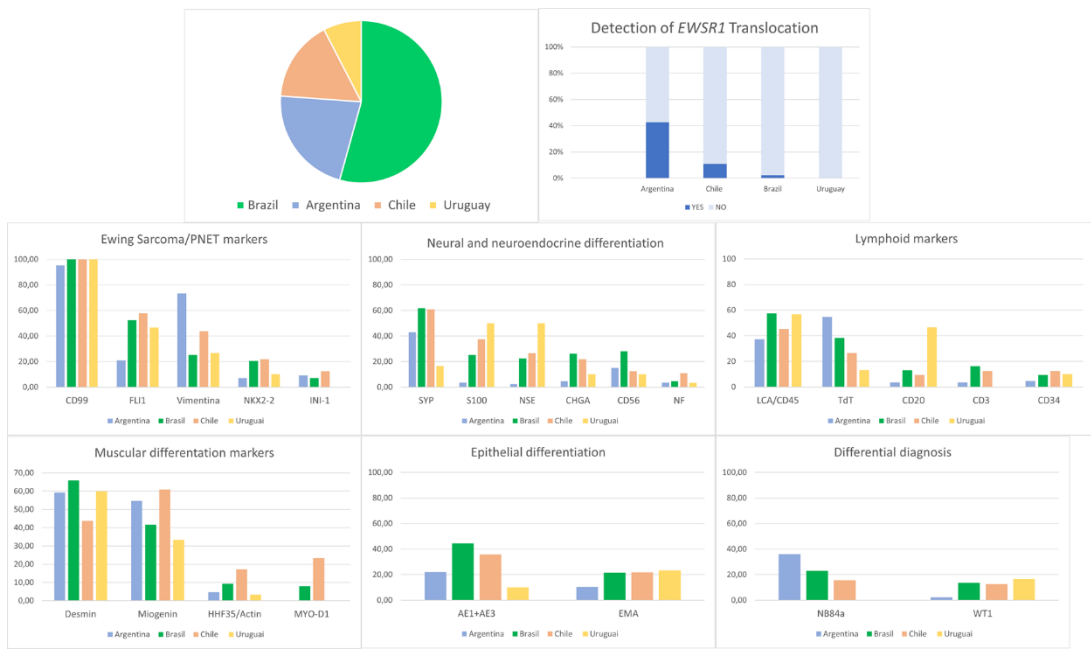
29. Yoshida A, Sekine S, Tsuta K, Fukayama M, Furuta K, Tsuda H. NKX2.2 is a useful immunohistochemical marker for Ewing sarcoma. *Am J Surg Pathol*. 2012 Jul;36(7):993-9.
30. Machado I, Charville GW, Yoshida A, Navarro S, Righi A, Gambarotti M, Scotlandi K, López-Guerrero JA, Llombart-Bosch A. Does PAX7 and NKX2.2 immunoreactivity in Ewing sarcoma have prognostic significance? *Virchows Arch*. 2022 Jan 5.
31. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Llorca A, Gallego S, Ban J, Kovar H, Notario V. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9937-47.
32. Chen S, Deniz K, Sung YS, Zhang L, Dry S, Antonescu CR. Ewing sarcoma with ERG gene rearrangements: A molecular study focusing on the prevalence of FUS-ERG and common pitfalls in detecting EWSR1-ERG fusions by FISH. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 Apr;55(4):340-9.
33. Tirado OM, Mateo-Lozano S, Villar J, Dettin LE, Llorca A, Gallego S, Ban J, Kovar H, Notario V. Caveolin-1 (CAV1) is a target of EWS/FLI-1 and a key determinant of the oncogenic phenotype and tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells. *Cancer Res*. 2006 Oct 15;66(20):9937-47.
34. Ribeiro-Dantas MDC, Oliveira Imparato D, Dalmolin MGS, de Farias CB, Brunetto AT, da Cunha Jaeger M, Roesler R, Sinigaglia M, Siqueira Dalmolin RJ. Reverse Engineering of Ewing Sarcoma Regulatory Network Uncovers PAX7 and RUNX3 as Master Regulators Associated with Good Prognosis. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 13;13(8):1860.
35. Machado, I.; Yoshida, A.; Morales, M.G.N.; Abrahao-Machado, L.F.; Navarro, S.; Cruz, J.; Lavernia, J.; Parafioriti, A.; Picci, P.; Llombart-Bosch, A. Review with novel markers facilitates precise categorization of 41 cases of diagnostically challenging, “undifferentiated small round cell tumors”. A clinicopathologic, immunophenotypic and molecular analysis. *Ann. Diagn. Pathol*. 2018, 34, 1–12.
36. Campbell, Kevin et al. “Comparison of Epidemiology, Clinical Features, and Outcomes of Patients with Reported Ewing Sarcoma and PNET over 40 Years Justifies Current WHO Classification and Treatment Approaches.” *Sarcoma* vol. 2018 1712964. 8 Aug. 2018, doi:10.1155/2018/1712964.
37. Parham DM, Hijazi Y, Steinberg SM, Meyer WH, Horowitz M, Tzen CY, Wexler LH, Tsokos M. Neuroectodermal differentiation in Ewing's sarcoma family of tumors does not predict tumor behavior. *Hum Pathol*. 1999 Aug;30(8):911-8.
38. Alava E, Kawai A, Healey JH, et al.: EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998;16(4):1248-55.
39. Abudu A, Mangham DC, Reynolds GM, et al.: Overexpression of p53 protein in primary Ewing's sarcoma of bone: relationship to tumour stage, response and prognosis. *Brit J Cancer* 1999;79(7-8):1185-9.

40. Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jurgens HF, Voute PA, Gadner H, Craft AW. Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 2000 Sep;18(17):3108-14.
41. Paulussen M, Ahrens S, Dunst J, et al.: Localized Ewing tumor of bone: final results of the Cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. *J Clin Oncol* 2001;19(6): 1818-29.
42. Rosito P, Mancini AF, Rondelli R, et al.: Italian Cooperative Study for the treatment of children and young adults with localized Ewing sarcoma of bone: a preliminary report of 6 years of experience. *Cancer* 1999;86(3):421-8.
43. Oberlin O, Le Deley MC, Bui BN, Gentet JC, Philip T, Terrier P, et al.: Prognostic factors in localized Ewing's tumours and peripheral neuroectodermal tumors: the third study of the French Society of Paediatric Oncology (EW88 study). *Brit J Cancer* 2001;85(11):1646-54.
44. Balamuth NJ, Womer RB. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol* 2010; 11: 184–192.
45. Riggi N, Knoechel B, Gillespie SM, Rheinbay E, Boulay G, Suvà ML, Rossetti NE, Boonseng WE, Oksuz O, Cook EB, Formey A, Patel A, Gymrek M, Thapar V, Deshpande V, Ting DT, Hornicek FJ, Nielsen GP, Stamenkovic I, Aryee MJ, Bernstein BE, Rivera MN. EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. *Cancer Cell* 2014; 26: 668-681.
46. Crompton BD, Stewart C, Taylor-Weiner A, Alexe G, Kurek KC, Calicchio ML, Kiezun A, Carter SL, Shukla SA, Mehta SS, Thorner AR, de Torres C, Lavarino C, Suñol M, McKenna A, Sivachenko A, Cibulskis K, Lawrence MS, Stojanov P, Rosenberg M, Ambrogio L, Auclair D, Seepo S, Blumenstiel B, DeFelice M, Imaz-Rosshandler I, Schwarz-Cruz Y Celis A, Rivera MN, Rodriguez-Galindo C, Fleming MD, Golub TR, Getz G, Mora J, Stegmaier K. The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov* 2014; 4: 1326-1341.
47. Lerman DM, Monument MJ, McIlvaine E, Liu XQ, Huang D, Monovich L, Beeler N, Gorlick RG, Marina NM, Womer RB, Bridge JA, Krailo MD, Randall RL, Lessnick SL; Children's Oncology Group Ewing Sarcoma Biology Committee. Tumoral TP53 and/or CDKN2A alterations are not reliable prognostic biomarkers in patients with localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer* 2015; 62: 759-765.
48. Shukla N, Schiffman J, Reed D, Davis IJ, Womer RB, Lessnick SL, Lawlor ER; COG Ewing Sarcoma Biology Committee. Biomarkers in Ewing sarcoma: the promise and challenge of personalized medicine. A report from the Children's Oncology Group. *Front Oncol* 2013; 3: 141.

**Table 1. Overall Immunohistochemistry panel**

Immunohistochemistry panel	Number analyzed	Positive +	Negative -	Not analyzed
<b>ES/PNET markers</b>				
CD99	394 (98.5%)	394 (100%)	0	6 (1.5%)
FLI1	183 (45.75%)	183 (100%)	0	217 (54.25%)
Vimentine	161 (40.1%)	149 (93.2%)	11 (6.8%)	239 (59.9%)
NKX2-2	61 (15.25%)	58 (95.1%)	3 (4.9%)	339 (84.75%)
INI-1	24 (6%)	23 (95.9%)	1 (4.1%)	376 (94%)
<b>Neural and neuroendocrine differentiation</b>				
SYP	180 (45%)	64 (35.6%)	116 (64.4%)	220 (55%)
S100	95 (23.75%)	23 (24.3%)	72 (75.7%)	305 (76.25)
NSE (enolase)	86 (21.5%)	43 (50%)	43 (50%)	314 (78.5%)
CHGA (chromogranin)	72 (18%)	3 (4.2%)	69 (95.8)	328 (82%)
CD56	72 (18%)	32 (45%)	40 (55%)	328 (82%)
NF (neurofilament)	19 (4.75%)	7 (37%)	12 (63%)	381 (95.25%)
<b>Muscular differentiation</b>				
Desmin	240 (60%)	1 (0.5%)	239 (99.5%)	160 (40%)
Myf-4/Miogenina	89 (47.25%)	1 (0.6%)	188 (99.4%)	211 (52.75%)
HHF35/actin	34 (8.5%)	1 (3%)	33 (97%)	366 (91.5%)
MYO-D1	34 (8.5%)	0	34 (100%)	366 (91.5%)
<b>Lymphoid differentiation</b>				
LCA/CD45	205 (51.25%)	0	195 (100%)	195 (48.75%)
TdT	105 (26.25%)	0	105 (100%)	295 (73.75%)
CD20	45 (11.25%)	0	45 (100%)	355 (88.75%)
CD3	45 (11.25%)	0	45 (100%)	355 (88.75%)
CD34	32 (8%)	1 (3%)	31 (97%)	368 (92%)
<b>Epithelial differentiation</b>				
AE1+AE3	142 (35.5%)	17 (12%)	125 (88%)	258 (64.5%)
EMA	70 (17.5%)	12 (7%)	58 (83%)	330 (82.5%)
<b>Differential diagnosis</b>				
NB84-a	58 (14.5%)	14 (24%)	44 (76%)	342 (85.5%)
WT-1	45 (11.25)	3 (6.7%)	42 (93.3%)	355 (88.75)

**Figure 1. Immunohistochemistry panel and molecular classification across countries.**



## 8. FUTURO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Desenvolver e ampliar o protocolo nacional de tratamento para pacientes portadores de tumores da Família Ewing para os centros do país que atendem crianças com câncer pelo Sistema Único de Saúde (SUS), aprovados em seus respectivos Comitês de Ética.
- Permitir que o maior número de centros no país faça aderência ao estudo, porque o tratamento de pacientes seguindo protocolos em oncologia pediátrica utilizando os conceitos das Boas Práticas Clínicas comprovadamente aumenta os índices de cura pela doença.
- Fazer revisão centralizada do diagnóstico da doença, não somente do anatomopatológico e imuno-histoquímica, mas por comprovação da presença da translocação EWS-FL1 nas células tumorais, pois o diagnóstico diferencial com outras patologias pode ser difícil e comprometer o tratamento mais adequado.
- Realizar estudos translacionais nas amostras dos pacientes utilizando dados moleculares e genéticos aliados a ferramentas de bioinformática para associações com o estudo clínico

Apesar dos avanços no entendimento das bases biológicas do sarcoma de Ewing, ainda não está definido qual sua célula de origem. Uma maior compreensão da identidade e origem celular é necessária para a identificação de marcadores e alvos terapêuticos (Pinto et al., 2011). A expressão de EWS-FL1 em células-tronco mesenquimais humanas (hMSC) resulta em um perfil de expressão gênica semelhante ao encontrado em sarcoma de Ewing, o que sugere uma origem mesenquimal (Riggi et al., 2008). Por outro lado, a assinatura molecular do sarcoma de Ewing apresenta várias semelhanças com a de células-tronco da crista neural (hNCSC), e a expressão de EWS-FL1 em hNCSC resulta em alterações de expressão gênica características de tumores de Ewing, indicando uma possível origem neuroectodérmica (von Levezow et al., 2011). Recentemente, o surgimento de sarcoma de Ewing também foi modelado pela expressão induzível de EWS-FL1 em células-tronco embrionárias humanas (hESC) (Gordon et al., 2015).

Análises em micrarranjos de DNA revelaram grande semelhança entre o sarcoma de Ewing e tecidos fetal, neural e endotelial (Staege et al., 2004). Além disso, muitos tumores de Ewing apresentam extensa diferenciação neural (Weissferdt et al., 2015). É possível que o sarcoma de Ewing tenha origem mesodérmica, mas que o EWS-FL1 promova então diferenciação neuroectodérmica, o que poderia explicar o fenótipo que mistura características mesenquimais e neurais (Riggi et al., 2009). Alguns marcadores neurais, como enolase neuronal-específica (NSE) foram estudados em sarcoma de Ewing.

No entanto, outras moléculas, como receptores de glutamato, que são características de neurônios, mas também encontrados em diferentes tipos tumorais, nunca foram investigados.

Além da origem e identidade celular, o grau de diferenciação pode influenciar a malignidade do sarcoma de Ewing, e a indução de um fenótipo mais diferenciado poder ser uma estratégia de redução de agressividade (Rocchi et al., 2010). A pluripotência de células de sarcoma de Ewing também parece estar relacionada com a progressão tumoral e resistência à quimioterapia, o que pode significar uma maior resistência de células-tronco tumorais. Por exemplo, os efeitos antitumorais de agentes quimioterápicos como a doxorrubicina são menores em células-tronco de sarcoma de Ewing positivas para CD133 e presentes em tumoresferas (Cornaz-Buros et al., 2014).

Na tentativa de compreender melhor a origem celular do Sarcoma de Ewing e caracterizar o tumor em termos de vias que regulam o desfecho desta célula em um fenótipo tumoral iremos selecionar dados de microarranjos de Sarcoma de Ewing depositados. Os dados serão avaliados utilizando-se o software The Transcriptogramer V.1 (da Silva et al., 2014; Rybarczyk-Filho et al., 2011). Com essa ferramenta, deixa-se de trabalhar com uma proteína e passa-se a trabalhar com um grupo destas. Após a seleção das vias mais importantes iremos passar para avaliação individual dos genes dentro das vias, na tentativa de caracterizar melhor o tumor não só em termos de vias, mas também em termos de genes obtendo assim um panorama mais completo.

Além disso, os resultados dessas análises irão nortear quais as vias e genes mais importantes que devem ser abordados em experimentos de bancada. É possível que a caracterização de marcadores, diferenciação e células-tronco revele subtipos de tumores biologicamente distintos em diferentes grupos de pacientes. A partir disso pretendemos explorar possíveis associações entre as alterações biológicas com o prognóstico e características clínicas.

Pretendemos investigar os transcritos de fusão em amostras de tumores de Ewing brasileiros e sul-americanos pelo uso de hibridização por fluorescência in situ (FISH), reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa (RT-PCR), microarranjos e sequenciamento e explorar correlações entre esses achados e o comportamento clínico. É possível induzir diferenciação para um fenótipo menos maligno. A promoção de diferenciação de células tumorais para um fenótipo mais maduro pode reduzir a capacidade de crescimento e invasão tumoral. É possível que, em tumores de Ewing, a diferenciação seja particularmente eficaz em reduzir a oncogênese (Rocchi et al., 2010).

Pretendemos identificar novas combinações de fatores de crescimento e outros compostos (por exemplo, moduladores epigenéticos, como inibidores de histona deacetilases; ver Nör et al., 2013) que promovam a diferenciação neural ou mesenquimal de células de sarcoma de Ewing, bem como caracterizar funcionalmente as células diferenciadas em termos de capacidade de sobrevivência, proliferação e migração.

A identificação de marcadores e alterações biológicas em amostras de tumores de Ewing irá contribuir para revelar novos potenciais alvos terapêuticos, os quais poderão então ser validados com o uso de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, mostramos recentemente que receptores de neurotrofinas da família Trk são expressos em tumores de Ewing e a inibição combinada de TrkA e TrkB reduz a proliferação e aumenta a sensibilidade à quimioterapia em células de sarcoma de Ewing (Heinen et al., 2016). Entre os novos alvos potenciais que podem ser manipulados experimentalmente por inibição farmacológica ou genética estão receptores de fatores de crescimento, proteína quinases que medeiam sinalização intracelular, e enzimas relacionadas à regulação epigenética.

Pretendemos usar análises por FISH para avaliar os números de cópias de 1q e 16q em amostras de tumores de pacientes brasileiros e sul-americanos, buscando correlações entre os achados, outros fatores prognósticos, e desfechos clínicos. Caracterizar os transcritos de fusão em de tumores de Ewing brasileiros e sulamericanos por hibridização por fluorescência *in situ* (FISH), reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa (RT-PCR), microarranjos e sequenciamento, e explorar suas relações com as características clínicas;

Verificar se há associações entre o perfil de marcadores de identidade celular e diferenciação em tumores de Ewing e o prognóstico e características clínicas: o marcadores neurais tais como Beta-III tubulina, receptor AMPA de glutamato (GluR1), receptores NMDA (NR1, NR2B), nestina, TrkA e TrkB; o marcadores mesenquimais tais como CD34, CD105, CD44, CD99 e vimentina o marcadores linfoides tais como CD19, CD45, LCA, CD3, CD20, CD43, CD79a, TdT e CD10 o marcadores mieloides tais como CD33, CD179a/b, CD123 BDCA-1/2/3, langerina, CD1a e CD14 o marcadores de células-tronco tais como CD133, Oct4, Sox2, Nanog, Bmi1 e Klf4. Este estudo está aprovado e já iniciou em alguns centros que participam do comitê de material biológico.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Adams R, et al: Rapid Sequence Tandem Transplant for Children with Metastatic Sarcoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 7(2):61-118, 2001 38. Womer RB, Daller RT, Fenton G, Miser JS. Granulocyte colony stimulating factor permits dose intensification by interval compression in the treatment of Ewing's sarcoma and soft tissue sarcomas in children. *European Journal of Cancer* 36:87- 94, 2000.

Albano D, Dondi F, Schumacher RF, D'Ippolito C, Porta F, Giubbini R, Bertagna F. Clinical and Prognostic Role of 18F-FDG PET/CT in Pediatric Ewing Sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2020 Mar;42(2):e79-e86.

Albergo JJ, Gaston CLL, Parry MC, Laitinen MK, Jeys LM, Tillman RM, Abudu AT, Grimer RJ. Risk analysis factors for local recurrence in Ewing's sarcoma: when should adjuvant radiotherapy be administered? *Bone Joint J*. 2018 Feb;100-B(2):247-255. doi: 10.1302/0301-620X.100B2.BJJ-2017-0222.R1. PMID: 29437069.

Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gardner H, Salzer- Kuntschik M: MIC2 Is a Specific Marker for Ewing's Sarcoma and Peripheral Neuroectodermal Tumors. *Cancer* 67: 1886-1893,1991.

Anderton J, Moroz V, Marec-Bérard P, Gaspar N, Laurence V, Martín-Broto J, Sastre A, Gelderblom H, Owens C, Kaiser S, Fernández-Pinto M, Fenwick N, Evans A, Strauss S, Whelan J, Wheatley K, Brennan B. International randomised controlled trial for the treatment of newly diagnosed EWING sarcoma family of tumours - EURO EWING 2012 Protocol. *Trials*. 2020 Jan 17;21(1):96.

Arancibia AM, De Farias CB, Brunetto AL, Roesler R, Gregianin LJ. The effect of hospital care volume on overall survival of children with cancer in Southern Brazil. *Pediatr Blood Cancer*. 2021 Mar;68(3):e28779.

Aryal A, Kumar VS, Shamim SA, Gamanagatti S, Khan SA. What Is the Comparative Ability of 18F-FDG PET/CT, 99mTc-MDP Skeletal Scintigraphy, and Whole-body MRI as a Staging Investigation to Detect Skeletal Metastases in Patients with Osteosarcoma and Ewing Sarcoma? *Clin Orthop Relat Res*. 2021 Aug 1;479(8):1768-1779.



Askin FB, Rosai J, Siblee RK, Dehner LP, Mc Alister WH: Malignant Small Cell Tumor of the Thoracopulmonare region in Childhood. *Cancer* 43:2438-2451,1979.

Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, et al.: Prognostic Factors in Nonmetastatic Ewing's Sarcoma of Bone Treated With Adjuvant Chemotherapy: Analysis of 359 Patients at the Istituto Ortopedico Rizzoli. *J Clin Oncol* 2000;18(1):4-11.

Becker, R.G., Gregianin, L.J., Galia, C.R. et al. What is the impact of local control in Ewing sarcoma: analysis of the first Brazilian collaborative study group – EWING1. *BMC Cancer* 17, 420 (2017).

Bernstein M, Kovar h, Paululussen M, et al. Ewing Sarcoma Famile of Tumors: Ewing Sarcoma of Bone and Soft Tissue and the Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumors; in Pizzo P, Poplack D: Principles and Practice of Pediatric Oncology. Fifth Edition. Lippincot Williams and Wilkins, 2006.

Brunetto AL, Castillo LA, Petrilli AS, Macedo CD, Boldrini E, Costa C, Almeida MT, Kirst D, Rodriguez-Galindo C, Pereira WV, Watanabe FM, Pizza M, Benites E, Morais V, Gadelha A, Nakasato A, Abujamra AL, Gregianin LJ; Brazilian Collaborative On behalf of the Brazilian Collaborative Study Group of Ewing Family of Tumors EWING1 and the Brazilian Society of Pediatric Oncology SOBOPE. Carboplatin in the treatment of Ewing sarcoma: Results of the first Brazilian collaborative study group for Ewing sarcoma family tumors-EWING1. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Oct;62(10):1747-53.

Burdach S, Jurgens H, Peters C, et al. Myeloablative radiochemotherape and hematopoietic stem-cell rescue in poor prognosis Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 11: 1482, 1993.

Campbell, Kevin et al. "Comparison of Epidemiology, Clinical Features, and Outcomes of Patients with Reported Ewing Sarcoma and PNET over 40 Years Justifies Current WHO Classification and Treatment Approaches." *Sarcoma* vol. 2018 1712964. 8 Aug. 2018.

Cangir A, Vietti TJ, Gehan EA, et al: Ewing's sarcoma metastasic at diagnosis. Results and comparisons of two intergroup Ewing's sarcoma studies. *Cancer* 66: 887, 1990.

Casey DL, Wexler LH, Meyers PA, Magnan H, Chou AJ, Wolden SL. Radiation for bone metastases in Ewing sarcoma and rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Mar;62(3):445-9.

Cash T, McIlvaine E, Krailo MD, Lessnick SL, Lawlor ER, Laack N, Sorger J, Marina N, Grier HE, Granowetter L, Womer RB, DuBois SG. Comparison of clinical features and outcomes in patients with extraskeletal versus skeletal localized Ewing sarcoma: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2016ct;63(10):1771-9.

Chin M, Yokoyama R, Sumi M, Okita H, Kawai A, Hosono A, Koga Y, Sano H, Watanabe H, Ozaki T, Mugishima H; Japan Ewing Sarcoma Study Group (JESS). Multimodal treatment including standard chemotherapy with e, vincristine, doxorubicin, cyclophosphamide, ifosfamide, and etoposide for the Ewing sarcoma family of tumors in Japan: Results of the Japan Ewing Sarcoma Study 04. *Pediatr Blood Cancer*. 2020 May;67(5):e28194.

Choy E, Butrynski JE, Harmon DC, et al. Phase II study of olaparib in patients with refractory Ewing sarcoma following failure of standard chemotherapy. *BMC Cancer*. 2014;14(1):813.

Cornaz-Buros S, Riggi N, DeVito C, Sarre A, Letovanec I, Provero P, Stamenkovic I. Targeting cancer stem-like cells as an approach to defeating cellular heterogeneity in Ewing sarcoma. *Cancer Res* 2014; 74: 6610-6622.

Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, et al. Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: Analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 18: 3108-3114, 2000.

da Silva, S.R., Perrone, G.C., Dinis, J.M., and de Almeida, R.M. Reproducibility enhancement and differential expression of non-predefined functional gene sets in human genome. *BMC genomics* 15, 1181. 2014

Dirksen U, Brennan B, Le Deley MC, Cozic N, van den Berg H, Bhadri V, Brichard B, Claude L, Craft A, Amler S, Gaspar N, Gelderblom H, Goldsby R, Gorlick R, Grier HE, Guinbretiere JM, Hauser P, Hjorth L, Janeway K, Juergens H, Judson I, Krailo M, Kruseova J, Kuehne T, Ladenstein R, Lervat C, Lessnick SL, Lewis I,

Linassier C, Marec-Berard P, Marina N, Morland B, Pacquement H, Paulussen M, Randall RL, Ranft A, Le Teuff G, Wheatley K, Whelan J, Womer R, Oberlin O, Hawkins DS; Euro-E.W.I.N.G. 99 and Ewing 2008 Investigators. High-Dose Chemotherapy Compared With Standard Chemotherapy and Lung Radiation in Ewing Sarcoma With Pulmonary Metastases: Results of the European Ewing Tumour Working Initiative of National Groups, 99 Trial and EWING 2008. *J Clin Oncol*. 2019 Dec 1;37(34):3192-3202.

Esiashvili N, Goodman M, Marcus RB Jr. Changes in incidence and survival of Ewing sarcoma patients over the past 3 decades: Surveillance Epidemiology and End Results Data. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008;30:425–430.

Felgenhauer JL, Nieder ML, Krailo MD, Bernstein ML, Henry DW, Malkin D, Baruchel S, Chuba PJ, Sailer SL, Brown K, Ranganathan S, Marina N. A pilot study of low-dose anti-angiogenic chemotherapy in combination with standard multiagent chemotherapy for patients with newly diagnosed metastatic Ewing sarcoma family of tumors: A Children's Oncology Group (COG) Phase II study NCT00061893. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 Mar;60(3):409-14.

Fisher C: Synovial sarcoma. *Ann Diagn Pathol* 1998;2(6): 401-21.

Fletcher CDM: Peripheral neuroectodermal tumors. In: Fletcher, C.D.M.: *Diagnostic Histopathology of Tumors*. Churchill Livingstone, 2000, pp 1698-1700.

Gaspar N, Hawkins DS, Dirksen U, Lewis IJ, Ferrari S, Le Deley MC, Kovar H, Grimer R, Whelan J, Claude L, Delattre O, Paulussen M, Picci P, Sundby Hall K, van den Berg H, Ladenstein R, Michon J, Hjorth L, Judson I, Luksch R, Bernstein ML, Marec-Bérard P, Brennan B, Craft AW, Womer RB, Juergens H, Oberlin O. Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 20;33(27):3036-46.

Gordon DJ, Motwani M, Pellman D. Modeling the initiation of Ewing sarcoma tumorigenesis in differentiating human embryonic stem cells. *Oncogene* 2015. doi: 10.1038/onc.2015.368.

Haveman LM, van Ewijk R, van Dalen EC, Breunis WB, Kremer LC, van den Berg H, Dirksen U, Merks JH. High-dose chemotherapy followed by autologous

haematopoietic cell transplantation for children, adolescents, and young adults with first recurrence of Ewing sarcoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021 Sep 2;9(9):CD011406.

Hawkins D, et al: Busulfan, melphalan and thiotepa ± total marrow irradiation with hematopoietic stem cell rescue for poor-risk Ewing's sarcoma family tumors. (PMID:10797354). *Med Ped Onc* 34:328-37, 2000.

Heinen TE, dos Santos RP, da Rocha A, dos Santos MP, Lopez PL, Silva-Filho MA, Kunzler-Souza B, Rivero LF, Becker, RG, Gregianin LJ Brunetto AB, Brunetto AT, de Farias CB, Roesler R. Trk inhibition reduces cell proliferation and potentiates the effects of chemotherapeutic agents in Ewing sarcoma. *Oncotarget*; in press.

Italiano A, Mir O, Mathoulin-Pelissier S, Penel N, Piperno-Neumann S, Bompas E, Chevreau C, Duffaud F, Entz-Werlé N, Saada E, Ray-Coquard I, Lervat C, Gaspar N, Marec-Berard P, Pacquement H, Wright J, Toulmonde M, Bessede A, Crombe A, Kind M, Bellera C, Blay JY. Cabozantinib in patients with advanced Ewing sarcoma or osteosarcoma (CABONE): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2020 Mar;21(3):446-455.

Kopp L, Hu C, Rozo B, et al. Utility of bone marrow aspiration and biopsy in initial staging of Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2014 doi: 10.1002/pbc.25212].

Kushner BH, Meyers PA. How Effective Is Dose-Intensive/Myeloablative Therapy Against Ewing's Sarcoma/Primitive Neuroectodermal Tumor Metastatic to Bone or Bone Marrow? The Memorial Sloan-Kettering Experience and a Literature Review. *J Clin Oncol* 19:870-880, 2001.

Gregianin L, A. Rose, M. Villarroel, S. Ferman, M.T. Almeida, G. Dufort, C. Salgado, G. Cea, A. Lastra, A.B. Costa Neves do Amaral, S. Epelman, S. de Almeida Selistre, K.E. de Sá Rodrigues, J.F. Cerutti Santos, L. Guimarães Pinto, A. Lunardi Brunetto. FP020 SIOP19-1738 Multicentric Study of Interval-Compressed Multiagent and Randomized Metronomic Chemotherapy for Patients with Localized Ewing Sarcoma: Results of the Latin American Pediatric Oncology Group Trial.[<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/pbc.27989>].

Ladenstein R, et al: Impact of megatherape in children with high-risk Ewing's tumours incomplete remission: a report from the EBMT Solid Tumour Registry. (PMID:7670398). *BMT*15:697-705, 1995.

Leavey PJ, Laack NN, Krailo MD, Buxton A, Randall RL, DuBois SG, Reed DR, Grier HE, Hawkins DS, Pawel B, Nadel H, Womer RB, Letson GD, Bernstein M, Brown K, Maciej A, Chuba P, Ahmed AA, Indelicato DJ, Wang D, Marina N, Gorlick R, Janeway KA, Mascarenhas L. Phase III Trial Adding Vincristine-Topotecan-Cyclophosphamide to the Initial Treatment of Patients With Nonmetastatic Ewing Sarcoma: A Children's Oncology Group Report. *J Clin Oncol*. 2021 Dec 20;39(36):4029-4038.

Leavey PJ, Laack NN, Krailo MD, Buxton A, Randall RL, DuBois SG, Reed DR, Grier HE, Hawkins DS, Pawel B, Nadel H, Womer RB, Letson GD, Bernstein M, Brown K, Maciej A, Chuba P, Ahmed AA, Indelicato DJ, Wang D, Marina N, Gorlick R, Janeway KA, Mascarenhas L. Phase III Trial Adding Vincristine-Topotecan-Cyclophosphamide to the Initial Treatment of Patients With Nonmetastatic Ewing Sarcoma: A Children's Oncology Group Report. *J Clin Oncol*. 2021 Dec 20;39(36):4029-4038.

Malempati S, Weigel B, Ingle AM, et al. Phase I/II trial and pharmacokinetic study of cixutumumab in pediatric patients with refractory solid tumors and Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2012;30(3):256–262.

Mc Keon C, Thiele CJ, Ross RA, et al: Indistinguishable pattern of protooncogene expression in two distinct but closely related tumors: Ewing's sarcoma and neuroepithelioma. *Cancer Res* 48:4307-4311, 1998.

Mora J, Castañeda A, Perez-Jaume S, Lopez-Pousa A, Maradiegue E, Valverde C, Martin-Broto J, Garcia Del Muro X, Cruz O, Cruz J, Martinez-Trufero J, Maurel J, Vaz MA, de Alava E, de Torres C. GEIS-21: a multicentric phase II study of intensive chemotherapy including gemcitabine and docetaxel for the treatment of Ewing sarcoma of children and adults: a report from the Spanish sarcoma group (GEIS). *Br J Cancer*. 2017 Sep 5;117(6):767-774.

Nör C, Sassi FA, de Farias CB, Schwartzmann G, Abujamra AL, Lenz G, AL, Roesler R. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate promotes cell death and differentiation and reduces neurosphere formation in human medulloblastoma cells. *Mol Neurobiol* 2013; 48: 533-543.

Oberlin O, Ree A, Desfachelles AS et al. Impact of High-Dose Busulfan Plus Melphalan As Consolidation in Metastatic Ewing Tumors: A Study by the Société Française des Cancers de l'Enfant. *J Clin Oncol* 24 (24 (August 20), 2006: pp. 3997-4002.

Orr WS, Denbo JW, Billups CA, Wu J, Navid F, Rao BN, Davidoff AM, Krasin MJ. Analysis of prognostic factors in extraosseous Ewing sarcoma family of tumors: review of St. Jude Children's Research Hospital experience. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 3816-3822.

Orthopaedicsone, 2022. Disponível online, acesso 01/04/2022; <https://www.orthopaedicsone.com/display/PORT/Ewing+Sarcoma+and+PNET>.

Picci P, Bohling T, Bacci G, et al.: Chemotherapy-induced tumor necrosis as a prognostic factor in localized Ewing's sarcoma of the extremities. *J Clin Oncol* 1997;15(4):1553-9.

Picci, B. T. Rougraff, G. Bacci et al., Prognostic significance of histopathologic response to chemotherapy in nonmetastatic Ewing's sarcoma of the extremities, *Journal of Clinical Oncology*, vol. 11, no. 9, pp. 1763–1769, 1993.

Pinto A, Dickman P, Parham D. Pathobiologic markers of the Ewing sarcoma family of tumors: state of the art and prediction of behaviour. *Sarcoma* 2011: 856190. Riggi N, Knoechel B, Gillespie SM, Rheinbay E, Boulay G, Suvà ML, Rossetti NE, Boonseng WE, Oksuz O, Cook EB, Formey A, Patel A, Gymrek M, Thapar V, Deshpande V, Ting DT, Hornicek FJ, Nielsen GP, Stamenkovic I, Aryee MJ, Bernstein BE, Rivera MN. EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. *Cancer Cell* 2014; 26: 668-681.

Pramanik R, Agarwala S, Gupta YK, Thulkar S, Vishnubhatla S, Batra A, Dhawan D, Bakhshi S. Metronomic Chemotherapy vs Best Supportive Care in Progressive

Pediatric Solid Malignant Tumors: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2017 Sep 1;3(9):1222-1227.

Soslow RA, Bhargava V, Warnke RA: MIC2, TdT, bcl-2, and CD34 expression in paraffin-embedded high-grade lymphoma/acute lymphoblastic leukemia distinguishes between distinct clinicopathologic entities. *Hum Pathol* 1997;28(10): 1158-65.

Riggi N, Suva ML, Stamenkovic I. Ewing's sarcoma origin: from duel to duality. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9: 1025-1030.

Riggi N, Suvà ML, Suvà 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.

Rodriguez-Galindo C, Liu T, Krasin MJ, Wu J, Billups CA, Daw NC, Spunt SL, Rao BN, Santana VM, Navid F. Analysis of prognostic factors in Ewing sarcoma family of tumors: Review of St. Jude Children's Research Hospital studies. *Cancer* 2007;110:375–384.

Rocchi A, Manara MC, Sciandra M, Zambelli D, Nardi F, Nicoletti G, Garofalo C, Meschini S, Astolfi A, Colombo MP, Lessnick SL, Picci P, Scotlandi K. CD99 inhibits neural differentiation of human Ewing sarcoma cells and thereby contributes to oncogenesis. *J Clin Invest* 2010; 120: 668-680.

Ruggiero A, Lanni V, Librizzi A, Maurizi P, Attinà G, Mastrangelo S, Giordano A, Riccardi R. Diagnostic Accuracy of 18F-FDG PET/CT in the Staging and Assessment of Response to Chemotherapy in Children With Ewing Sarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2018 May;40(4):277-284.

Rustici, G., Kolesnikov, N., Brandizi, M., Burdett, T., Dylag, M., Emam, I., Farne, A., Hastings, E., Ison, J., Keays, M., et al. (2013). ArrayExpress update--trends in database growth and links to data analysis tools. *Nucleic acids research* 41, D987-990.

Rybarczyk-Filho, J.L., Castro, M.A., Dalmolin, R.J., Moreira, J.C., Brunnet, L.G., and de Almeida, R.M. (2011). Towards a genome-wide transcriptogram: the *Saccharomyces cerevisiae* case. *Nucleic acids research* 39, 3005-3016.

Sandoval C, Meyer WH, Parham DM, et al. Outcome in 43 children presenting with metastatic Ewing's sarcoma: the St Jude Children's Research Hospital experience, 1962 to 1992. *Med Pediatr Oncol* 26:180-185, 1996.

Sankar S, Theisen ER, Bearss J, et al. Reversible LSD1 inhibition interferes with global EWS/ETS transcriptional activity and impedes Ewing sarcoma tumor growth. *Clin Cancer Res.* 2014;20(17):4584–4597.

Schleiermacher G, Peter M, Oberlin O, et al. Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized Ewing tumor. *J Clin Oncol.* 2003;21:85–91).

Schwartz GK, Tap WD, Qin LX, et al. Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: a multicentre, open-label, Phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(4):371–382.

Sharib J, Horvai A, Gray Hazard FK, Daldrup-Link H, Goldsby R, Marina N, DuBois SG. Comparison of latino and non-latino patients with Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2014; 61: 233-237.

Spurny C, Kailayangiri S, Jamitzky S, et al. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression is not a predominant feature in Ewing sarcomas. *Pediatr Blood Cancer.* 2018;65(1):e26719.

Stewart E, Goshorn R, Bradley C, et al. Targeting the DNA repair pathway in Ewing sarcoma. *Cell Rep.* 2014;9(3):829–840.

Tap WD, Demetri G, Barnette P, et al. Phase II study of ganitumab, a fully human anti-type-1 insulin-like growth factor receptor antibody, in patients with metastatic Ewing family tumors or desmoplastic small round cell tumors. *J Clin Oncol.* 2012;30(15):1849–1856.



Tawbi HA, Burgess M, Bolejack V, et al. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, Phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(11):1493–1501.

Thiel U, Wawer A, von Luettichau I, Bender HU, Blaeschke F, Grunewald TG, Steinborn M, Röper B, Bonig H, Klingebiel T, Bader P, Koscielniak E, Paulussen M, Dirksen U, Juergens H, Kolb HJ, Burdach SE. Bone marrow involvement identifies a subgroup of advanced Ewing sarcoma patients with fatal outcome irrespective of therapy in contrast to curable patients with multiple bone metastases but unaffected marrow. *Oncotarget.* 2016 Oct 25;7(43):70959-70968.

van Maldegem AM, Bovée JV, Peterse EF, Hogendoorn PC, Gelderblom H. Ewing sarcoma: the clinical relevance of the insulin-like growth factor 1 and the poly-ADP-ribose-polymerase pathway. *Eur J Cancer.* 2016;53:171–180.

von Levetzow C, Jiang X, Gwye Y, von Levetzow G, Hung L, Cooper A, Hsu JH, Lawlor ER. Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells. *PLoS One* 2011; 6: e19305.

Wagner L, Turpin B, Nagarajan R, Weiss B, Cripe T, Geller J. Pilot study of vincristine, oral irinotecan, and temozolomide (VOIT regimen) combined with bevacizumab in pediatric patients with recurrent solid tumors or brain tumors. *Pediatr Blood Cancer.* 2013 Sep;60(9):1447-51.

Wagner LM, Fouladi M, Ahmed A, et al. Phase II study of cixutumumab in combination with temsirolimus in pediatric patients and young adults with recurrent or refractory sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62(3):440–444.

Weissferdt A, Kalhor N, Moran CA. Ewing sarcoma with extensive neural differentiation: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular analysis of three cases. *Am J Clin Pathol* 2015; 143: 659-664.

Whang-Peng J, Triche TJ, Knutsen T: Chromosome translocation in peripheral neuroepithelioma. *N Engl J Med* 311:584-585,1984.

Whelan JS, Burcombe RJ, Janinis J, et al. A systematic review of the role of pulmonare irradiation in the management of primare bone tumours. *Ann Oncol* 13:23-30, 2002.

Womer RB, West DC, Krailo MD, Dickman PS, Pawel BR, Grier HE, Marcus K, Sailer S, Healey JH, Dormans JP, Weiss AR. Randomized controlled trial of interval-compressed chemotherapy for the treatment of localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2012 Nov 20;30(33):4148-54.

Wunder JS, Paulian G, Huvos AG, Heller G, Meyers PA, Healey JH. The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:1020–1033.

Zhu H, Li Y, Xie X, Zhang S, Xue Y, Fan T. Efficacy of Local Control Strategies for Ewing Sarcoma After Neoadjuvant Chemotherapy: A Network Meta-analysis. *Indian Pediatr*. 2020 Jun 15;57(6):527-532. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32221054.