MÁRCIA DATZ ABADI

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DO OSTEOSSARCOMA EM PACIENTES
COM E SEM METASTÁSES E SUA CORRELAÇÃO PROGNÓSTICA**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração:
Ortopedia e Traumatologia**

**Orientador:
Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo**

**São Paulo
2005**

MÁRCIA DATZ ABADI

**ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DO OSTEOSSARCOMA EM PACIENTES
COM E SEM METASTÁSES E SUA CORRELAÇÃO PROGNÓSTICA**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração:
Ortopedia e Traumatologia**

**Orientador:
Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo**

**São Paulo
2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Abadi, Márcia Datz

Análise imunohistoquímica do osteossarcoma nos pacientes com e sem metástases e sua correlação prognóstica / Márcia Datz Abadi.-- São Paulo, 2005.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Ortopedia e Traumatologia.

Área de concentração: Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Olavo Pires de Camargo.

Descritores: 1.OSTEOSARCOMA/patologia 2.IMUNOHISTOQUÍMICA/métodos
3.PROGNÓSTICO 4.PROTEÍNA P53 5.PROTEÍNA PROTO-ONCOGÊNICA C-KIT
6.ANTÍGENO NUCLEAR DE CÉLULA EM PROLIFERAÇÃO 7.RECEPTOR
ERBB-2 8.GLICOPROTEÍNA P

USP/FM/SBD-282/05

Para meu filho André, que desde a vida intra-uterina me dividiu com a Medicina e com a vida acadêmica; que mesmo ainda muito pequeno me fez aprender o que é o amor incondicional, imensurável, infinito; ensinou-me o que é a minha razão de viver.

Para meu marido Maurício, amor da minha vida, parceiro de todos os momentos, pai do meu filho querido, paciente e perseverante com meus momentos de abnegação, incansável na força que sempre me deu na minha vida pessoal e profissional.

Para minha mãe, Eliane, sinônimo de força e garra, ensinando-me sempre a seguir em frente, a traçar os melhores caminhos com os melhores valores, segurando na minha mão nos momentos de angústia e revelando-me através de gestos delicados os passos a serem seguidos para eu chegar até aqui.

Para meu pai, Germano, que sempre me mostrou o significado de afeto e carinho e ensinou-me a trabalhar e lutar para alcançar meus ideais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo, meu orientador, que me abriu as portas para o conhecimento dos tumores músculo-esqueléticos e ensinou-me a perseguir os ideais da vida acadêmica.

Agradeço ao Prof. Dr. Vicente Odone Filho, meu mestre, por me ensinar amar a oncologia pediátrica, por seu brilhantismo científico, mas, principalmente, por me ensinar a ética na Medicina e o humanismo com que trata o seu semelhante.

Agradeço à Dra. Claudia Regina Gomes Cardim Mendes de Oliveira, chefe da Patologia do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT), pelas horas perdidas dedicando-se à minha dissertação com empenho e detalhismo.

Agradeço ao Dr. Israel Bendit, grande incentivador desta dissertação, da minha iniciação no universo da ciência básica e da biologia molecular, tão importante no entendimento e tratamento das doenças oncológicas.

À Dra. Renée Zon Filippi, minha amiga pessoal e também grande patologista pela ajuda e incentivo a esta dissertação.

À minha amiga Telma Murias dos Santos, que sempre esteve ao meu lado desde a minha iniciação na oncologia pediátrica e sempre me incentivou a enveredar pelo mundo acadêmico.

À bióloga Rita de Cássia Araújo Melo Góis Pinto, pelo enorme trabalho que dedicou a esta dissertação, pessoa-chave na realização da técnica de imunohistoquímica e pela sua curiosidade científica que a levou ao domínio desta técnica.

Aos colegas da Patologia do IOT, em especial ao Carlos Fernando Saito e ao Sérgio Antônio Barbosa do Nascimento, a Antônia Xavier da Silva, Aparecida Ferreira dos Santos Correia, Natalina de Freitas Alves dos Santos, Maria Neide Martins, Yuriko Sonoda Honda, Cleide Snatos Ribeiro e Marcelo Costa pelas horas perdidas ajudando-me a armazenar as amostras, fazendo e selecionando as lâminas de cada paciente, fotografando as figuras e pela paciência; sempre prestativos, prontos a ajudar-me em todos os momentos.

Aos meus colegas do Grupo de Oncologia Ortopédica do IOT, Marcelo Tadeu Caieiro, André Mathias Baptista e Prof. Alberto Tesconi Crocci, que estão ao meu lado na luta pelo melhor tratamento dos pacientes com tumores ósseos, perfeccionistas, buscando os melhores resultados.

A todos os enfermeiros do IOT, principalmente os da enfermagem infantil (Arlete M.M. Giovani, Ana Maria Carlos, Graziela G. Maragni, Luiz Augusto Santos, Sérgio Ricardo de Souza, Fabiana Garpelli, Yara M. P. Oliveira, Julio César Shinzato e os auxiliares) e do setor de pré-operatório (Sônia Maria Gomes da Silva e Raimunda Pereira de Araujo), que vivenciam diariamente a nossa luta pelos pacientes com tumores ósseos, e sentem conosco as alegrias e tristezas deste dia-a-dia.

Aos meus colegas do ITACI, Dra. Lílian Maria Cristofani, Dra. Maria Tereza Assis Almeida, Dr. Paulo T. Maluf, Dr. Roberto Augusto Plaza Teixeira, Dra. Ana Lucia Cornachioni e aos residentes de onco-pediatria, por estarem ao meu lado na difícil luta contra as neoplasias pediátricas e pela demonstração de amor e dedicação aos nossos pacientes.

Aos meus colegas da radiologia do IOT, Dr. Carlos Henrique Longo, Dr. Laércio Rosenberg, Dr. Bordallo, ao João Oli Silva e aos residentes desta especialidade, pela paciência e ajuda nas medições e estadiamento dos tumores.

À minha família, meu filho André, meu marido Maurício, minha mãe Eliane, meu pai Germano, meu irmão Flávio, meus cunhados, meus sogros, meu padrasto, meus tios, meus primos e meus sobrinhos, minha maior estrutura, o significado da palavra solidez, todos incentivadores e grandes apoios na minha profissão.

Aos pacientes e seus familiares que, a cada dia, surpreendem-me com sua sabedoria e garra na luta pela vida e pela possibilidade de ensinar-me a lidar com o ser humano da melhor maneira possível.

“Never regard study as a duty, but as the enviable opportunity to learn to know the liberating influence of beauty in the realm of the spirit for your own personal joy and to the profit of the community to which your later work belongs.”

(Albert Einstein)

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses, monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

A ortografia foi revisada de acordo o dicionário ortográfico de língua portuguesa através do site: www.academia.org.br.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 OSTEOSSARCOMA.....	7
2.1.1 ASPECTOS GERAIS DO OSTEOSSARCOMA.....	7
2.1.2 FATORES CLÍNICOS DE PROGNÓSTICO.....	11
2.2 MARCADORES BIOLÓGICOS.....	14
2.2.1 P-GLICOPROTEÍNA.....	14
2.2.2 PCNA.....	18
2.2.3 ERBb-2.....	21
2.2.4 C-KIT.....	27
2.2.5 P53.....	31
2.2.6 MDM2.....	36
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	40
3.1 CASUÍSTICA.....	41
3.2 MÉTODOS.....	42
3.2.1 ASPECTOS CLÍNICOS.....	42
3.2.2 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS E CLASSIFICAÇÃO.....	53
3.2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4. RESULTADOS.....	58
5. DISCUSSÃO.....	80
6. CONCLUSÃO.....	91
7. BIBLIOGRAFIA.....	93
8. ANEXOS.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

Kda	kilodalton
mM	milimol
μl	microlitro
ml	mililitro
SLE	sobrevida livre de eventos
SLD	sobrevida livre de doença
SG	sobrevida global
Pgp	p-glicoproteína
PCNA	antígeno celular de proliferação celular
DNA	ácido desoxi-ribonucleico
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
PCR	reação da polimerase em cadeia
RT-PCR	reação da polimerase em cadeia com transcriptase reversa
FISH	hibridização in situ com fluorescência
Dist	distal
Prox	proximal
Neg	negativo
Pos	positivo

Meta	metástase
Sem	semana
AD	altas doses
DT	dose total
ID	identificação
QT	quimioterapia

RESUMO

ABADI, M.D. *Análise imunohistoquímica do osteossarcoma em pacientes com e sem metástases e sua correlação prognóstica*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 128 p.

Até a década de 1960, o osteossarcoma era curável somente em aproximadamente 20% dos casos. Com o advento da quimioterapia neoadjuvante e adjuvante no tratamento destes tumores, a sobrevida global e livre de eventos aumentou significativamente, elevando as taxas de cura para mais de 60% naqueles pacientes sem metástases ao diagnóstico. Na quimioterapia convencional, nem novas classes de drogas melhoraram estas taxas; além disso, pacientes com metástases ao diagnóstico continuam a apresentar um prognóstico sombrio. O objetivo deste estudo é avaliar a biologia desta doença nos pacientes envolvidos no Grupo Brasileiro de Tratamento de Tumores Ósseos, através da técnica de imunohistoquímica das proteínas p53, MDM-2, c-Kit, ErbB-2, PCNA e p-glicoproteína, correlacionando os achados com o prognóstico destes pacientes. As proteínas p53, MDM-2, c-Kit, ErbB-2, p-glicoproteína e PCNA foram coradas pelo método streptavidina-biotina-peroxidase nas amostras de 43 tecidos tumorais parafinados e analisadas independentemente por dois patologistas. A avaliação estatística foi realizada pelo teste de Fisher e Qui-quadrado. Curvas de Kaplan-Meyer foram testadas pelo teste log-rank e o modelo de regressão de Cox foi aplicado para análise multivariada. O p-53 foi positivo em 23,1% (9/39), PCNA em 71,4% (25/35), p-glicoproteína em 40,5% (15/37), MDM-2 em 34,8% (8/23), c-kit em 67,6% (25/37) e ErbB-2 em 17,9% (7/39) das amostras. Na análise univariada, a presença de metástases ao diagnóstico, a positividade de p53 e de ErbB-2 influenciaram o prognóstico individualmente. Entretanto, na análise multivariada, a presença de metástase ao diagnóstico revelou-se o único fator de prognóstico estatisticamente significativo. Em conclusão, a expressão de ErbB-2 nos osteossarcomas está associada com pior prognóstico e a positividade de p53 correlaciona-se com a presença de metástase ao diagnóstico. Porém, a presença de metástases ao diagnóstico suplanta os fatores acima e estabelece-se como o único fator verdadeiramente significativo no modelo multivariado. A alta incidência de positividade de c-kit nas nossas amostras pode indicar futuras direções nas terapias-alvo e prováveis melhoras nas taxas de cura de pacientes acometidos por esta doença.

Descritores: osteossarcoma, imunohistoquímica, p53, MDM-2, c-kit, PCNA, ErbB-2, p-glicoproteína, prognóstico.

SUMMARY

ABADI MD. *Immunohistochemistry analysis of osteosarcoma in patients with and without metastasis and its prognosis correlation*. [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2005. 128 p.

Until the decade of 1960, osteosarcoma was curable around 20% of the cases. With the advent of neo and adjuvant chemotherapy in osteosarcoma's treatment, both overall and event free survival improved significantly, with cure rates of more than 60% in those without metastasis at diagnosis. Neither conventional chemotherapy, nor new drugs have improved these rates and patients with metastasis at diagnosis continue to have a dismal prognosis. The objective of this study is to evaluate the biology of that disease in patients enrolled at the Brazilian Group for Osteosarcoma Treatment, by immunohistochemistry study of p53, MDM2, c-Kit, ErbB-2, PCNA and P-glycoprotein, and correlate these findings with prognosis of this patients. The proteins p53, MDM2, c-kit, ErbB-2, Pglycoprotein and PCNA were stained by streptavidin-biotin-peroxidase method in samples of 43 paraffined embedded tissue tumor at diagnosis and independently analyzed by two pathologists. Statistical evaluation was done by qui-square and Fisher test, Kaplan Meyer curves were tested by log-rank test and Cox regression model was applied for the multivariate analysis. The p53 was positive in 23,1% (9/39), PCNA in 71,4% (25/35), Pglycoprotein in 40,5% (15/37), MDM-2 in 34,8% (8/23), c-kit in 67,6% (25/37) and ErbB-2 in 17,9% (7/39) of the samples. The presence of metastasis at diagnosis, the positivity of p53 and ErbB-2 individually influenced the prognosis in the univariate analysis. However, the multivariate analysis showed the presence of metastasis at diagnosis as the only statistically significant factor. In conclusion, the expression of ErbB-2 in osteosarcoma is associated with worse prognosis and p53 positivity correlates with the presence of metastasis at diagnosis. However, the hazard factor represented by the presence of metastasis at diagnosis places this factor as the only one truly significant in a multivariate model. The high incidence of c-kit positivity in our samples can indicate future directions for target therapies and improvement in the cure rates.

Keywords: osteosarcoma, immunohistochemistry, p53, MDM-2, c-kit, ErbB-2, p-glycoprotein, PCNA, prognosis.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO:

O osteossarcoma é uma rara neoplasia de alto grau de agressividade, de origem mesenquimal, caracterizado por formação irregular de osso primitivo e produção de matriz osteóide (SCHAJOWICZ et al., 1995).

Representa 2,4% das neoplasias da criança e do adolescente e 56% dos tumores ósseos malignos desta faixa etária (Detailed Guide: Osteosarcoma What Are The Key Statistics About Osteosarcoma?, 2003).

Seu pico de incidência ocorre na segunda e na terceira década de vida (DORFMAN e CZERNIAK, 1995). A etiologia do osteossarcoma ainda permanece desconhecida, mas sabe-se que seu período de maior incidência coincide com o estirão puberal, época de crescimento rápido dos ossos longos, sugerindo assim uma correlação entre esta fase da vida e o aparecimento do tumor (LINK et al., 2002). Há, também, um discreto predomínio do sexo masculino sobre o feminino (58% incidência no sexo masculino) (DAHLIN e UNNI, 1996).

Sua incidência nos EUA é de 900 casos novos ao ano ou 6,5 pacientes por milhão de crianças por ano (Detailed Guide: Osteosarcoma What Are The Key Statistics About Osteosarcoma?, 2003). No Brasil, estima-se que haja 350 casos novos ao ano (PETRILLI et al, 2004).

Sua localização preferencial são as metáfises dos ossos longos, com os três principais sítios no fêmur distal, tíbia proximal e úmero proximal (DAHLIN e COVENTRY, 1967). Atualmente, os osteossarcomas são classificados em diversos tipos: primariamente, baseados na classificação histológica (osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, rico em células gigantes, epitelióide, pequenas células ou

telangectásico); ou na localização da lesão (parosteal, periosteal ou intra-medular). O tipo convencional, emergindo da cavidade intra-medular do osso, representa aproximadamente 75% de todos os osteossarcomas (MERTENS et al., 1993).

Até a década de 1970, a única terapia disponível para o tratamento de osteossarcoma era cirúrgica, visto que estes tumores são extremamente resistentes à radioterapia. As técnicas cirúrgicas desta época eram restritas, quase que limitadas à amputação do membro acometido. Entretanto, apesar das cirurgias radicais, o prognóstico era sombrio: 10-25% de pacientes sem metástases visíveis ao diagnóstico inicial permaneciam vivos sem doença após cinco anos de cirurgia (DAHLIN e COVENTRY, 1967; MARCOVE et al., 1970; TAYLOR et al., 1978; CAMPANACCI et al., 1981). Nos anos 70, surge um novo conceito no tratamento dos sarcomas ósseos. CORTES et al. (1972), JAFFE et al. (1977), JAFFE et al. (1978) e ROSEN et al. (1983) reportam que a quimioterapia poderia apresentar resultados no tratamento do osteosarcoma. Os agentes quimioterápicos por eles utilizados são doxorrubicina e metotrexate em altas doses com resgate com ácido folínico.

Em meados dos anos 70, surge o conceito de quimioterapia pré-operatória introduzido por ROSEN et al. (1976/79), também chamada neo-adjuvante (com presença de doença mensurável), com o objetivo de avaliar respostas *in vivo*, diminuir a probabilidade de metástases, e permitir cirurgias mais conservadoras, voltadas à preservação do membro acometido. Desde então, diversos estudos vêm sendo realizados, com importante sucesso no número de pacientes sobreviventes do osteossarcoma. Chegam, nos dias de hoje, a 60-70% de sobrevida livre de doença em cinco anos, com os protocolos de quimioterapia mais recentes (BACCI et al., 1993; SOUHAMI et al., 1997; FERRARI et al., 2001; MEYERS et al., 1992.; PROVVISOR et al., 1997.). Em 1982, inicia-se o primeiro estudo multi-institucional de osteossarcoma

(MIOS) randomizado e controlado, desenhado para testar o papel da quimioterapia adjuvante no tratamento dos sarcomas ósseos. Terapia controversa até esta data, devido principalmente ao estudo conduzido pela Mayo Clinic (Rochester, EUA), que não consegue demonstrar benefício da quimioterapia adjuvante com metotrexate em doses elevadas. As análises preliminares do MIOS, após dois anos do seu início, indicam expressiva diferença na sobrevida dos pacientes que receberam quimioterapia (66% de SLD em 5 anos para os que receberam quimioterapia e 11% de SLD no grupo que só tratou com cirurgia), motivo porque a randomização do estudo foi fechada em 1984 (LINK et al, 1991).

Infelizmente, 15-20% dos pacientes que possuem metástases sistêmicas (pulmonares e ósseas, principalmente) ao diagnóstico inicial (momento da biópsia), apresentam um prognóstico ruim, com uma sobrevida livre de eventos menor que 10% em cinco anos (BACCI et al., 1997; HARRIS et al., 1998). No Brasil, tal número de pacientes com metástases ao diagnóstico inicial é ainda maior: em torno de 40%, segundo dados do último levantamento realizado pelo Grupo Brasileiro de Tratamento de Tumores Ósseos¹.

Dos pacientes com doença não-metastática ao diagnóstico, 30-40% poderão recidivar em cinco anos (BRAMWELL et al., 1992; BACCI et al., 1993; SOUHAMI et al., 1997; PROVISOR et al., 1997; FUCHS et al., 1998; FERRARI et al., 1999.).

O fator de prognóstico desfavorável mais importante ao diagnóstico é a presença de metástases (MEYERS, 1997). A pouca resposta histológica à quimioterapia é também considerada um dos fatores de prognóstico desfavoráveis mais relevantes na sobrevida de pacientes com osteossarcoma (LINK et al., 1991; GLASSER et al., 1992; DAVIS et al., 1994). Além destes fatores, o volume tumoral ao diagnóstico (≥ 150 ml),

¹ PETRILLI AS. (Escola Paulista de Medicina). Dados referentes ao Grupo Brasileiro de Tratamento de Tumores Ósseos 2000. [Apresentado no Simpósio Interinstitucional de Oncologia Ortopédica; 2004; São Paulo]

bem como a idade ao diagnóstico (= 12 anos), são indicativos incontestes de um pior prognóstico nos pacientes com osteossarcoma de alto grau, tratados com cirurgia e poliquimioterapia (DAVIS et al., 1994; BIELING et al, 1996; SAETER et al., 1997; FERRARI et al., 2001).

Nos últimos 10 anos, tentativas de alterações ou de intensificações dos regimes quimioterápicos, com o intuito de melhorar as respostas terapêuticas, não aumentaram significativamente o prognóstico destes pacientes, demonstrando a necessidade de identificação de marcadores preditivos, que possam ser utilizados em novas abordagens terapêuticas não convencionais (BRAMWELL, 1997; BACCI, et al., 2000).

Ainda são desconhecidos fatores biológicos de prognóstico que, além de indicar pacientes de risco para recidiva, poderiam sugerir uma intervenção mais agressiva nestes pacientes ou a estratificação de pacientes em sub-grupos de alto e baixo risco para recaídas, visando melhorar a expectativa de cura dos pacientes de alto-risco e minimizar a toxicidade do tratamento naqueles de baixo risco. Em outras neoplasias da infância, como no neuroblastoma ou na leucemia linfocítica aguda, características biológicas ao diagnóstico contribuem à estratificação destes pacientes em grupos de risco, como a presença do oncogene *n-myc* amplificado ou a presença de *bcr-abl*, respectivamente (BRODEUR et al, 1984; BRODEUR, 2000; ARICO et al., 2000).

Diferentemente da família de tumores Ewing -- o segundo tumor ósseo primário mais comum nesta mesma faixa etária -- não foi encontrado, até o presente momento, nenhum marcador biológico que caracterize o osteossarcoma, ou que determine seu prognóstico, tornando sua origem genética e seus fatores de prognóstico desafiadores à ciência atual (LLOMBART-BOSCH e NAVARRO, 2001).

O objetivo deste estudo é demonstrar características biológicas dos osteossarcomas de pacientes tratados no período de 2000-2004 no IOT/HCFMUSP,

através da técnica de imunohistoquímica, e sua relação com o prognóstico, que permita a estratificação dos pacientes em grupos de risco de recaída da doença nos futuros protocolos de tratamento multi-institucionais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 OSTEOSSARCOMA:

2.1.1 ASPECTOS GERAIS DO OSTEOSSARCOMA:

BOYER apud MEHLMAN (2002), um médico francês (cirurgião pessoal de Napoleão), em 1805, utiliza pela primeira vez o termo osteossarcoma e o descreve como uma entidade distinta de outras lesões, como o osteocondroma.

Em 1847, DUPUYTREN apud MEHLMAN (2002) escreve: “osteossarcoma, que é uma verdadeira degeneração cancerosa óssea, manifesta-se na forma de massa esbranquiçada ou avermelhada, lardácea e firme num estágio precoce da doença; mas apresenta, num período tardio, pontos de amolecimento, material cerebriforme, extravazamento sangüíneo, e um líquido branco de consistência viscosa no seu interior”.

Em 1921, sob os auspícios do Colégio Americano de Cirurgiões, CODMAN apud MEHLMAN (2002) cria o Registro de Sarcoma Ósseo, etapa significativa nos estudos deste raro tumor.

Nos meados do século XX, JAFFE apud MEHLMAN (2002) publica livros-textos devotados à patologia óssea, sendo a ele creditada a importância de organizar este ramo da medicina.

Em 1980, ENNEKING, um cirurgião ortopédico, introduz seu sistema de estadiamento cirúrgico dos sarcomas musculo-esqueléticos, o que ajuda a organizar o planejamento cirúrgico da biópsia e da ressecção tumoral de osteossarcomas e de outros tumores musculo-esqueléticos até os dias atuais. Este sistema divide os tumores ósseos

malignos em baixo (estádio I) e alto grau (estádio II) e, este último, em intra (A) ou extracompartimental (B). Os pacientes com metástases à distância são considerados como estágio III.

O osteossarcoma é definido como um tumor ósseo primário maligno, derivado do mesênquima primitivo formador de osso e caracterizado por produção de tecido osteóide ou de osso imaturo, por células fusiformes estromais malignas (SCHAJOWICZ et al., 1995).

Um terço dos tumores ósseos da infância são malignos, dos quais o osteossarcoma é o mais comum, totalizando 35% dos sarcomas primários do osso e aproximadamente 60% dos tumores malignos ósseos nas primeiras duas décadas de vida (LINK et al., 2002).

Seu pico de incidência ocorre na segunda e na terceira década de vida, coincidindo com a fase de estirão puberal da adolescência, com uma discreta predominância do sexo masculino sobre o sexo feminino. O tumor apresenta predileção pelas metáfises dos ossos longos, sendo o fêmur distal a sua localização mais comum, seguido da tíbia proximal e do úmero proximal. Isto tudo leva a pensar que seu desenvolvimento está relacionado com o rápido crescimento dos ossos e com a incapacidade de correção de possíveis erros no processo de crescimento e remodelamento dos ossos (DAHLIN e UNNI, 1996).

Corresponde à sexta causa de neoplasia mais freqüente na faixa etária pediátrica (0-18 anos) e à terceira em crianças maiores e adolescentes (12-18 anos), precedida pelas leucemias e pelos linfomas (PROVISOR, 1997).

A apresentação clínica mais comum é o aparecimento de dor local, acompanhada ou não do aumento do volume da área acometida, com tempo de evolução de, em média, três meses. Muitos pacientes não apresentam qualquer sintoma e procuram o

serviço médico por trauma, sendo diagnosticada a fratura patológica. A presença de sintomas sistêmicos, como febre e perda de peso, não é comum ao diagnóstico inicial, e, quando presentes, indicam doença avançada. De quinze a vinte por cento dos pacientes apresentam macrometástases no momento do diagnóstico inicial, sendo nos pulmões a sua localização mais comum (LINK et al., 2002).

O diagnóstico é feito através da biópsia da lesão óssea, devendo, esta, ser realizada por profissional experiente e familiarizado com a doença, para que não haja risco de disseminação no ato cirúrgico (LINK et al., 2002).

A biópsia é centrada em critérios histopatológicos, sempre correlacionada com os achados radiográficos e a história clínica. O aspecto histológico do osteossarcoma convencional permite que este grupo seja subdividido, baseado na diferenciação primária do componente mesenquimal. Os subtipos mais comuns são: osteoblásticos, condroblásticos e fibroblásticos. Há, ainda, uma menor incidência de outros padrões, como: epitelióide, rico em células gigantes, células pequenas e telangiectásico. Os diagnósticos diferenciais mais importantes do ponto de vista histopatológico são feitos com os outros tumores de origem mesenquimal, porém não produtores de matriz osteóide, como o condrossarcoma e o fibrossarcoma (DAHLIN e UNNI, 1996).

2.1.2 FATORES CLÍNICOS DE PROGNÓSTICO:

Apesar da raridade de incidência do osteossarcoma, muitos estudos têm procurado identificar fatores de risco que possam influenciar na história natural e no prognóstico deste tumor.

HUDSON et al., em 1990, relatam a experiência de 10 anos de tratamento do osteossarcoma no MD Anderson Cancer Center, Texas, EUA, ressaltando a importância do volume tumoral e da percentagem de necrose tumoral induzida pela quimioterapia pré-operatória como os fatores de prognóstico considerados significantes em relação ao desenvolvimento de metástases pulmonares.

PETRILLI et al, em 1991, avaliam os resultados de 92 casos de osteossarcoma tratados com quimioterapia pré-operatória intra-arterial (cisplatina), seguidos de cirurgia conservadora ou radical e de quimioterapia intra-venosa pós-operatória. Seus resultados demonstram que o grande volume tumoral (tumores > 15 cm), os pacientes do sexo masculino, o baixo índice de necrose induzida pela quimioterapia pré-operatória e o sub-tipo histológico não-osteoblástico são fatores preditivos de recorrência ou óbito.

MEYERS et al, em 1992, analisam 612 pacientes com osteossarcoma não-metastático e revelam que níveis séricos de fosfatase alcalina e desidrogenase láctica são variáveis significantes na sobrevida livre de doença numa análise multivariada, bem como a resposta histológica à quimioterapia neo-adjuvante.

DAVIS et al, em 1994, publicam uma revisão narrativa baseada na análise de oito artigos de 1973 a 1992, concluindo que a variável prognóstica mais importante para pacientes com osteossarcoma de extremidade foi a presença de necrose tumoral após

quimioterapia pré-operatória. Nesta revisão, não há consenso da significância prognóstica do sexo, idade, localização e do tamanho tumoral.

BIELING et al, em 1996, fazem uma análise do volume tumoral e do seu valor prognóstico em 128 osteossarcomas agressivos, comparando diferentes métodos de mensuração do volume tumoral. Concluem que o melhor método para avaliação deste parâmetro baseia-se na medida tridimensional; seu ponto de corte, de 150 ml, distingue grupos com prognósticos significativamente diferentes.

SAETER et al, em 1997, apresentam uma revisão dos fatores de prognóstico em sarcomas ósseos, mostrando que a detecção de metástases ao diagnóstico, volume tumoral, e a resposta histológica do tumor primário à quimioterapia pré-operatória, são dados de valor indubitável, enquanto que sexo, idade, sítio tumoral, sub-tipo histológico e expressão do gene de múltipla resistência a drogas (MDR), não são tratados pela literatura de forma consensual como variáveis relevantes.

FERRARI et al, em 2001, confirmam, através de um estudo de 300 pacientes com osteossarcoma localizado de extremidades, a significância preditiva do volume tumoral no prognóstico destes indivíduos, demonstrada em estudos anteriores. Pacientes com volume tumoral ≥ 150 ml apresentam um prognóstico significativamente pior do que aqueles com tumores menores. Este estudo também possibilita ao autor indicar que idade e qual subtipo histológico são fatores que podem influenciar na sobrevida livre de doença em pacientes com osteossarcoma não-metastático de extremidades tratados com quimioterapia neo-adjuvante.

BACCI et al, em 2002, avaliam uma casuística de 560 pacientes com osteossarcoma de alto grau de extremidades, tratados com cinco protocolos diferentes de quimioterapia neoadjuvante entre 1983 e 1995. Através de análise multivariada,

somente dois fatores são estatisticamente significantes: os níveis de fosfatase alcalina sérica pré-tratamento e o grau de necrose induzida por quimioterapia.

RECH et al, em 2004, após revisão retrospectiva de 50 casos, demonstram que a presença de doença metastática, os níveis séricos de desidrogenase láctica ao diagnóstico (>1000 UI/ml), ou a necrose tumoral após quimioterapia pré-cirúrgica ($< 90\%$) são fatores de prognóstico ruim.

2.2 MARCADORES BIOLÓGICOS:

2.2.1 P-GLICOPROTEÍNA:

O aumento da expressão da p-glicoproteína é, inicialmente, descrito em linhagens celulares expostas a concentrações crescentes de drogas anti-neoplásicas e associado à amplificação do gene de resistência a múltiplas drogas (RIORDAN et al., 1985).

Uma das grandes causas do insucesso terapêutico é a presença de mecanismos que conferem à célula neoplásica resistência ao tratamento proposto. O gene *MDR1* codifica uma proteína de 170 Kda, denominada p-glicoproteína, que atravessa a membrana celular em toda a sua extensão. A p-glicoproteína apresenta um domínio extracelular e uma porção intracelular. Esta proteína atua como uma bomba de efluxo energia-dependente, responsável pela eliminação de inúmeros agentes quimioterápicos do interior da célula tumoral, incluindo a doxorrubicina, usualmente utilizada no tratamento do osteossarcoma (PASTAN e GOTTESMAN, 1987).

O gene *MDR1* codifica a p-glicoproteína da classe I, responsável pela resistência a drogas em humanos, enquanto os genes *MDR2* e *MDR3* codificam a p-glicoproteína humana da classe III, cuja função ainda não está estabelecida (VAN DER BLIEK et al., 1987; GEORGES et al., 1990). A p-glicoproteína é codificada por uma família de genes conservada através da escala filogenética (NG et al., 1989).

A resistência a múltiplas drogas é um processo associado ao aumento da expressão do gene *MDR1*. Este fenômeno é descrito no linfoma não-Hodgkin (MILLER

et al., 1990), no rabdomiossarcoma, nos sarcomas indiferenciados (CHAN et al, 1990), no carcinoma de mama (VERRELLE et al, 1991), na leucemia mielóide aguda (CAMPOS et al., 1992) e no neuroblastoma (GOLDSTEIN et al, 1990; CHAN et al, 1991). O aumento da expressão do gene nestes tumores está associado a um pior prognóstico.

BALDINI et al, em 1995, utilizam a técnica de imunohistoquímica para analisar 92 materiais de biópsias de osteossarcomas. Demonstram que a presença de p-glicoproteína aumentada nestes materiais está associada à diminuição da sobrevida livre de eventos destes pacientes (80% SLE em pacientes p-glicoproteína positivos x 42% SLE nos p-glicoproteínas negativos).

SCOTLANDI et al., em 1996, realizam um estudo *in vitro* e *in vivo*, com a inclusão de 92 pacientes com osteossarcoma, analisando a associação da expressão de p-glicoproteína à agressividade local e à disseminação do osteossarcoma. Neste estudo, os autores observam uma diminuição da habilidade tumorigênica e metastática nas células de osteossarcomas com a presença do gene *MDR*. Concluem que a associação do fenótipo *MDR* com um prognóstico desfavorável não é causada pelo aumento concomitante da capacidade de invasão e metastatização; mas, é mais provável ser devida à menor resposta às drogas citotóxicas.

CHAN et al., em 1997, num estudo retrospectivo de 62 pacientes, concluem que a expressão de p-glicoproteína nas células tumorais é correlacionada à falha no tratamento dos pacientes com osteossarcoma e à piora nas taxas de sobrevida destes pacientes (94% Pgp negativo x 35% Pgp positivo).

ALVES, em 1998, estuda a correlação clínico-anátomo-patológica e imunohistoquímica de marcadores de agressividade tumoral em 60 casos de osteossarcomas

no Brasil. Dentre os marcadores utilizados, a p-glicoproteína (clone C494) encontra-se positiva em 45% dos casos. Conclui que não há correlação de p-glicoproteína com óbito e com probabilidade de metástases.

BALDINI et al., em 1999, correlacionam a expressão de Pgp com o prognóstico nos osteossarcomas tratados somente com doxorrubicina em adição a cirurgia. A expressão de Pgp foi estudada, por imunohistoquímica, em amostras de 37 pacientes com osteossarcoma. A positividade da expressão de Pgp nas células tumorais ao diagnóstico foi significativamente associada à maior taxa de recaída sistêmica.

SCOTLANDI et al., em 1999, concluem que os osteossarcomas metastáticos não apresentam, freqüentemente, expressão da Pgp-170 ao diagnóstico, como nos não-metastáticos. Esta característica sugere que o potencial metastático não estaria relacionado à presença desta proteína. Isto é comprovado em ensaios *in vitro*, onde as células de osteossarcoma com expressão do gene *MDR1* teriam menor tumorigenicidade, menor habilidade de migração, invasão e adesão; portanto, menor chance de metastatizar.

HORNICEK et al., em 2000, realizam um estudo retrospectivo de quarenta pacientes com osteossarcoma, utilizando a técnica de imunofluorescência. Destes, 33 pacientes foram estadiados como IIB e sete como III. Dos pacientes com doença estágio IIB, 15 pacientes apresentaram expressão de p-glicoproteína e 18 obtiveram níveis indetectáveis. Sessenta e sete por cento (67%) dos 15 pacientes (10/15) com osteossarcoma estágio IIB que expressaram a p-glicoproteína desenvolveram metástases, comparados com 28% (cinco de dezoito) com níveis indetectáveis desta proteína. Os autores concluem que a expressão de p-glicoproteína nas células tumorais parece estar associada a um aumento nove vezes maior de óbitos e a um aumento cinco

vezes maior de desenvolvimento de metástases em pacientes com osteossarcoma estágio IIB, predizendo um pior prognóstico para aqueles que expressam esta proteína.

WUNDER et al., em 2000, analisam a expressão do gene *MDR1* em 123 pacientes acometidos por osteossarcoma de extremidades, não-metastático, de alto grau. Não identificam qualquer relação entre a expressão de RNAm *MDR1* e progressão de doença em pacientes com osteossarcoma.

Segundo PARK et al. (2001), a co-expressão de p53 e Pgp é o indicador mais forte de diminuição de sobrevida de acordo com análise multivariada de 52 tumores por imunohistoquímica (Pgp positiva em 35% das 52 amostras de osteossarcoma).

Em 2003, SERRA et al., publicam um estudo com 149 pacientes diagnosticados portadores de osteossarcoma não-metastático, primário de alto grau, tratados através de protocolos de quimioterapia baseados na utilização de doxorubicina, metotrexate em altas doses e cisplatina, além da adição de ifosfamida na adjuvância. Utilizando a técnica de imunohistoquímica, estes autores estudam a expressão de Pgp nos tumores destes pacientes. Foi encontrada positividade em 47 dos 149 casos (32%), significativamente associada a um aumento da incidência de recaídas neste grupo e a um pior prognóstico, assim como à idade, abaixo de 12 anos, e ao volume tumoral, maior que 150 ml ao diagnóstico.

Em 2003, PAKOS e IOANNIDIS conduzem uma meta-análise de 14 estudos envolvendo 631 pacientes que avalia a correlação entre a expressão da p-glicoproteína, a resposta histológica à quimioterapia e a progressão de doença (morte, metástase ou recorrência). As evidências disponíveis mostram conclusivamente que a presença da p-glicoproteína não está associada à resposta histológica de pacientes com osteossarcoma aos diversos regimes quimioterápicos. Em contrapartida, a positividade de Pgp,

determinada por imunohistoquímica, é fortemente correlacionada à mais rápida progressão de doença, dobrando seu risco.

FERRARI et al, em 2004, estudam a expressão da p-glicoproteína em biópsias de tumores primários e em metástases pulmonares de 19 pacientes. Os dados do estudo revelam que a maioria dos casos exibe uma maior expressão de p-glicoproteína nas metástases pulmonares recorrentes, do que no tumor primário.

2.2.2 ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

(PCNA):

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é originalmente descrito por MIYACHI et al., em 1978, como um antígeno nuclear presente em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico. Este antígeno parece ter papel na fase de iniciação da proliferação celular, como proteína não-histona auxiliadora da δ -DNA polimerase (FAIRMAN et al., 1990; BRAVO et al., 1987).

ROBBINS et al., em 1987, relatam que a expressão de PCNA apresenta-se elevada em um grande número de células proliferativas originárias de vários tumores, como os carcinomas de mama, colon, pulmão, rim, estômago, ovário e de testículo. A positividade do PCNA apresenta correlação com a atividade mitótica e com a diferenciação tumoral.

KURKI et al., em 1988, realizam um estudo com a utilização da citometria de fluxo e demonstram que a expressão de PCNA estaria aumentada durante a fase G1 do ciclo celular, com pico na fase S, e diminuindo durante a fase G2/M. Seu peso molecular é de 36kDa e sua concentração reflete o estado proliferativo das células normais e transformadas (GALAND & DEGRAEF, 1989).

GARCIA et al., em 1989, e CHANO et al., em 1996, demonstram que a imunohistoquímica efetuada através da utilização do anticorpo monoclonal PCNA provê um método simples de acesso à fração de crescimento tumoral.

Além de estar presente na fase de replicação, o PCNA também participa no processo de reparo do DNA. BORRELLO et al., em 1993, reportam a importância dos mecanismos de reparo do DNA na etiologia da resistência a drogas quimioterápicas. Segundo estes autores, é possível que altos níveis de expressão de PCNA sinalizem uma maior capacidade de reparo do DNA e, portanto, uma menor sensibilidade aos efeitos de drogas quimioterápicas que dependem da lesão no DNA para sua ação citotóxica.

PARK e PARK, em 1995, avaliam a expressão do PCNA em 34 osteossarcomas. O padrão de coloração foi nuclear em todos os casos, com 35,3% dos tumores mostrando positividade superior a 40%. Demonstram também uma correlação fraca entre p53 e PCNA, neste estudo.

HASEGAWA et al, em 1997, mostram, pela técnica de imunohistoquímica, que a expressão de PCNA pode ter importância prática como um índice objetivo de mensuração da atividade de proliferação. O número de células PCNA-positivas (22/30 tumores) correlaciona-se com o grau histológico dos osteossarcomas, neste trabalho.

ALVES, em 1998, estuda 60 casos de osteossarcomas no Brasil, através do método de imunohistoquímica. Dentre os marcadores utilizados, o índice médio de

PCNA (clone PC10) foi de 40,7 %. Neste estudo, houve correlação estatística entre os índices de PCNA e anaplasia. Também foi observado forte associação entre quantidade de matriz extra-celular e os índices de PCNA.

KAKAR et al, em 2000, utilizando a técnica de imunohistoquímica, descrevem um trabalho de avaliação do PCNA em treze biópsias de osteossarcomas, e não observam nenhuma correlação entre necrose tumoral e PCNA.

OLIVEIRA, em 2002 reporta, em um estudo retrospectivo, que a expressão de PCNA estaria elevada no osteossarcoma e teria uma relação direta com a recidiva da doença. Sugere, assim, que a presença de PCNA poderia estar relacionada à resistência ao tratamento quimioterápico.

Em 2003, SAKAYAMA et al, analisam dez pacientes com osteossarcoma osteoblástico de fêmur distal, distinguindo a atividade de proliferação celular (PCNA) nas regiões osteoblásticas e nas não-osteoblásticas, no mesmo tumor. Destacam uma diferença significativa entre estas duas regiões na análise imunohistoquímica do PCNA e no de outro marcador, o AgNOR. Concluem que a habilidade proliferativa e o grau de malignidade são maiores nas regiões não-osteoblásticas, indicando que o efeito da quimioterapia pode ser prejudicado nestas regiões. Além disso, são analisadas três amostras de metástases pulmonares: tanto o índice PCNA, quanto o número AgNOR, mostram valores aumentados em relação à lesão primária destes pacientes; tal achado seria resultante de uma maior resistência das células tumorais metastáticas à quimioterapia.

Em 2003, JUNIOR et al, analisam a expressão do PCNA e de outros marcadores em 25 osteossarcomas de cabeça e pescoço. O PCNA apresenta uma positividade em 92% dos casos (64% fortemente positivo, 16% moderadamente

positivo, 12% fracamente positivo). Neste trabalho, os autores não encontraram relação entre marcadores imunohistoquímicos e o prognóstico dos pacientes.

2.2.3 ErbB-2:

Os receptores de tirosino-quinases são mediadores primários de diversos sinais e determinam o destino celular: crescimento, diferenciação, migração ou morte celular. São enzimas alostéricas de superfície celular, consistindo em um domínio transmembrana único, separando um domínio quinase intracelular de um domínio extracelular de acoplamento do ligante. Esta ligação induz a uma homo ou heterodimerização dos receptores, ambas essenciais à ativação da tirosino-quinase, e subsequente recrutamento de proteínas-alvo que iniciam a cascata de sinalização (VAN DER GEER et al, 1994).

A família de tirosino-quinases ErbB consiste em quatro receptores transmembrana: ErbB-1 (também chamado receptor de fator de crescimento epidermal-EGFR), ErbB-2 (também chamado HER2 ou neu), ErbB-3 e ErbB-4. Receptores HER-like são encontrados em membranas citoplasmáticas de formas simples e nas formas ancestrais de vida, indicando sua conservação na evolução filogenética. Devido às diversas interações receptor-receptor (ErbB-1/ErbB-2, ErbB-3/ErbB-2, etc...), a família ErbB gera uma rede de sinais, com enorme potencial para diversificação de mensagens biológicas. Seis ligantes foram caracterizados para o receptor ErbB-1, incluindo EGF, TGF α , anfiregulina, fator de crescimento EGF-like ligado a heparina (HB-EGF), betacelulina (β -cel) e epiregulina. Os ligantes para os receptores ErbB-3 e 4, neuregulinas (NRG), são predominantemente expressos em órgãos parenquimais e no sistema nervoso central e periférico do embrião (ALROY e YARDEN, 1997). Todos estes

ligantes possuem uma região de 45-55 aminoácidos, que inclui seis resíduos de cisteína, suficiente para o acoplamento e para a ativação do receptor. Nenhum ligante ErbB-2 específico foi identificado até o momento, mas o receptor ErbB-2 é o parceiro preferencial para a heterodimerização de outros receptores. Os heterodímeros contendo ErbB-2 são relativamente mais potentes e possuem uma meia-vida mais longa que os demais (ALROY e YARDEN, 1997; YARDEN, 2001).

O receptor HER-2 é codificado pelo gene *HER-2*, um proto-oncogene situado na região 17q21. A proteína HER2 é uma glicoproteína transmembrana, com 1255 aminoácidos e 185 Kda. Também é designada p185^{c-erbB2} (COUSSENS et al., 1985; RUBIN e YARDEN, 2001).

O proto-oncogene *neu*, também chamado *HER2* ou *c-erbB-2*, é originalmente identificado em tumores neuroectodérmicos de ratos e, posteriormente, seu correspondente é isolado em humanos. Este gene humano codifica um receptor de fator de crescimento, designado HER-2, devido a sua similaridade com o receptor de fator de crescimento epidermal. O receptor HER-2 possui um papel importante no crescimento e diferenciação celular normal, cooperando com outros receptores HER através de uma rede complexa de sinais. A proteína HER-2 é frequentemente expressa em uma variedade de células e tipos teciduais normais, excetuadas as de origem hematopoiéticas (YARDEN, 2001). Entretanto, a amplificação do gene *HER-2* induz à superexpressão do receptor, que pode levar ao desenvolvimento de vários tipos de neoplasias humanas, incluindo, de mama, ovários e de trato gastro-intestinal. Altos níveis de ErbB-2 são correlacionados a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama. Este gene está amplificado em 20-30% das neoplasias de mama. Tal amplificação está associada a um comportamento mais agressivo destes tumores (HYNES e STERN, 1994).

Além da utilidade clínica do HER-2 na obtenção de informações prognósticas e preditivas para o manuseio e tratamento destes pacientes, a super-expressão de receptores HER2 representa um alvo ideal para terapias anti-câncer específicas. O desenvolvimento estratégico do anticorpo monoclonal anti-HER2, a Herceptina®² (trastuzumab) é um exemplo de terapia alvo-específica. Como este receptor é expresso em níveis baixos nos tecidos normais, a imunoterapia levaria a mínimos danos às células normais. O emprego do trastuzumab em estudos fase II e III, isolado ou em combinação com outros quimioterápicos, foi bem tolerado em pacientes com câncer de mama e já incorporado ao tratamento de pacientes com lesões metastáticas (RUBIN e YARDEN, 2001; BASELGA, 2001).

ONDA et al, em 1996, estudam 26 tecidos de osteossarcoma humanos para amplificação e expressão do *c-erbB-2*, através da técnica de imunohistoquímica, “Southern Blot” e da análise de polimorfismo gênico por RT-PCR. A proteína ErbB-2 foi detectada em 42% das amostras (11/26), pela análise imunohistoquímica. Entretanto, nenhuma amplificação gênica ou evidência de mutação genética específica é encontrada nestes materiais. A expressão do ErbB-2 está fortemente correlacionada ao aparecimento de metástases pulmonares precoces e à baixa taxa de sobrevida destes pacientes, sugerindo que o ErbB-2 possui um papel significativo no crescimento de tumores agressivos e na promoção do potencial metastático nos osteossarcomas.

ALVES, em 1998, estudando 60 casos de osteosarcoma no Brasil, encontra imuno-expressão do EbrB-2 (anticorpo policlonal) em 42,4%. Conclui que a positividade de ErbB-2 não se correlaciona com óbito ou probabilidade de metástases. Neste estudo, houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão de p-53 e ErbB-2, sugerindo um processo de múltiplas etapas na progressão tumoral.

² Herceptin/Trastuzumab® desenvolvido por Genentech (San Fransisco, CA, EUA) e comercializado por Roche (Nutley, NJ, EUA).

GORLICK et al, em 1999, através do estudo de 53 amostras de biópsia, demonstram uma positividade de 45,3% de expressão de altos níveis de HER2 (24/53) e uma correlação estatisticamente significativa da expressão de HER2 com pior resposta histológica à QT pré-operatória e pior sobrevida livre de eventos nos pacientes positivos, sugerindo seu valor como indicador prognóstico.

MORRIS et al, em 2001, relatam sobrevida livre de doença inferior àqueles pacientes com expressão de HER2/erbB-2, em 53 casos. No momento da biópsia, 42,6% das amostras mostram super-expressão de HER2/erbB-2. Em cinco anos, 78% dos indivíduos sem evidência de expressão de HER2/erbB-2 estavam vivos e sem doença, comparados a 40% de pacientes com expressão do gene. É verificada, também, uma associação entre a resposta histológica à quimioterapia pré-operatória e a expressão de HER2/erbB-2. Estes dados sugerem que o HER2/erbB-2 tem um papel na biologia tumoral e no crescimento tumoral agressivo. De acordo com seu estudo, a expressão do HER2/erbB-2 pode ser um marcador útil na determinação de prognóstico anterior ao início do tratamento.

KILPATRICK et al, em 2001, não observam positividade membranosa nos 41 casos de osteossarcoma por eles estudados com dois anticorpos distintos. A positividade citoplasmática foi documentada em 83-98% dos casos. Seu estudo conclui que a positividade citoplasmática não está associada à resposta histológica da quimioterapia ou à progressão de doença.

MAITRA et al, em 2001, não encontram evidência da amplificação do gene *HER2/neu* pela técnica de FISH. Além disso, todas as suas amostras são negativas pela técnica de imunohistoquímica, em 21 casos, demonstrando que a amplificação deste gene parece ser um evento incomum tanto nos tumores primários, quanto em doenças metastáticas em osteossarcomas em crianças.

THOMAS et al, em 2002, demonstram uma ausência de expressão do *HER2/neu* em osteossarcoma e no sarcoma de Ewing. Pelos seus achados, de 66 casos, não é evidenciada positividade membranosa normalmente associada à expressão de tirosino-quinases de membrana, apesar de 44% das amostras demonstrarem uma coloração difusa granular citoplasmática. Pela técnica de RT-PCR, nenhuma amostra de osteossarcoma apresenta amplificação do RNAm *HER2/neu*. Concluem, assim, que o *HER2/neu* não é expresso por estes sarcomas, e, portanto, não é um fator de prognóstico importante. A terapia com o anticorpo monoclonal anti-*HER2/neu* não seria apropriada para tais pacientes.

Em 2003, ZHOU et al, publicam artigo indicando que a expressão de HER está associada a um pior prognóstico (sobrevida livre de metástases) em pacientes com ou sem metástases ao diagnóstico, podendo ser um achado distinto de fenótipo tumoral de maior agressividade em osteossarcoma. São realizadas técnicas imunohistoquímicas e análise por FISH de 25 pacientes com osteossarcoma. A maioria das amostras exhibe reatividade focal ou difusa citoplasmática, enquanto que a coloração membranosa do HER2 é raramente observada. A expressão de HER2 positivo é identificada em 44% (11/25) de amostras de tumores primários e em 58% de amostras de sítios pulmonares metastáticos.

ANNINGA et al, em 2004, estudam a expressão do gene *HER-2* pela amplificação deste gene (FISH), pelo RNA mensageiro (RT-PCR) e pela expressão da proteína (imunohistoquímica), em 30 pacientes. Somente uma amostra indica imunorreatividade de membrana, considerada positiva por este estudo. A positividade citoplasmática focal é vista em duas amostras, mas não é considerada como positiva pelos critérios adotados pelos autores. A única amostra positiva por imunohistoquímica não é confirmada pelas técnicas de FISH ou de RT-PCR, sugerindo que esta reação

fosse falso-positiva. Seus resultados mostram que o *HER2* não tem função na biologia tumoral do osteossarcoma e que, estudos pilotos usando trastuzumab como droga com potencial de inibição tumoral, não são benéficas a pacientes com este tumor ósseo.

FERRARI et al, em 2004, avaliam a presença de p-glicoproteína, ErbB-2, p53 e Bcl-2 em 29 amostras de tumores primários e em 55 amostras de metástases por imunohistoquímica. A positividade de ErbB-2 é de seis, em 19 amostras na biópsia inicial. Somente a expressão celular de ErbB-2 influencia o padrão de recorrência. Pacientes com ErbB-2 positivo nos tumores primários apresentaram um menor intervalo livre de recorrência e uma maior probabilidade de desenvolver metástases. Este estudo sugere que o ErbB-2 possui um papel no processo metastático do osteossarcoma.

HUGHES et al, em 2004, utilizam as técnicas de imunohistoquímica, real-time PCR (RT-PCR), Western-blot e citometria de fluxo para determinar o padrão de expressão da família ErbB e sua importância na patogênese do osteossarcoma. De acordo com este estudo, a expressão de HER-2 e EGFR na superfície celular e a localização nuclear do fragmento p80 ativado do HER-4 sugerem que os três membros desta família de tirosino-quinases podem contribuir na patogênese do osteossarcoma e que terapia anti-receptores desta família poderia ser benéfica para os pacientes de osteossarcoma.

2.2.4 C-KIT:

O proto-oncogene *c-kit* codifica a proteína KIT, receptor de membrana tirosino-quinase para fator de células-tronco (SCF) (YARDEN et al., 1987).

O gene *c-kit* está localizado no cromossomo quatro (q11-12), em humanos, e no cromossomo cinco, em ratos. O anticorpo peptídeo e-kit permite a identificação da glicoproteína de 145.000 dalton, produto do gene *c-kit*, que está inserida na membrana plasmática celular, e é capaz de se auto-fosforilar em resíduos de tirosina nos glioblastomas multiformes e em fibroblastos de ratos transfectados (YARDEN et al., 1987).

A KIT é estruturalmente relacionada a receptores de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), a fatores de estimulação de colônias de macrófagos e ao receptor de tirosino-quinase FMS-like (FLT3), todos tirosino-quinases. Ela é expressa numa grande variedade de tipos celulares, dentre eles: mastócitos, células progenitoras hematopoiéticas, melanócitos, células germinativas e células marca-passo gastro-intestinais (DeMATTEO, 2002; AKIN e METCALFE, 2004).

Três mecanismos de ativação de KIT nas células tumorais têm sido descritos: a estimulação autócrina e/ou parácrina dos receptores pelo seu ligante (SCF), a ativação cruzada por outras quinases e/ou perda da regulação da atividade fosfatase, e a aquisição de mutações ativadoras. O ligante natural da KIT é conhecido como kit ligante, fator de células-tronco, fator “steel”, ou fator de crescimento de mastócitos. A ativação do receptor pelo ligante resulta numa cascata de proteínas intracelulares que promovem a sobrevivência e proliferação celular (KONDOH et al., 1995; HEINRICH et al., 2002).

A super-ativação dos sinais da proteína KIT, através do ganho de função por mutações, está associada à sobrevivência, à proliferação e à transformação oncogênicas em

outros tipos celulares que expressam a molécula. Mutações em c-Kit têm sido descritas em tumores gastrointestinais estromais (GIST), tumores de células germinativas, neoplasias hematopoiéticas (doenças mielo e linfoproliferativas), na mastocitose, carcinoma de células pequenas pulmonar, neuroblastoma, melanoma, carcinoma de ovário e no carcinoma de mama. As mutações ocorrem em diversos sítios da molécula KIT, nas diferentes doenças neoplásicas, identificadas nos exons 9, 11, 13 e 17 (HIROTA et al., 1998; DeMATTEO, 2002).

A co-expressão do RNA mensageiro do fator de células-tronco (SCF) e o *c-kit* são reportados em alguns casos de leucemia mielóide aguda, tumores de células redondas pulmonares, carcinoma de mama e de neuroblastoma. Isto leva ao desenvolvimento da hipótese da existência de uma alça autócrina entre o SCF e c-kit (PIETSCH et al., 1992; COHEN et al., 1994; HINES et al., 1995; KRYSTAL et al., 1996).

A molécula KIT consiste em três porções: extra-celular, trans-membrana e intra-celular. Semelhante a outros receptores tirosino-quinases tipo III, a porção mais interna intra-celular contém um domínio tirosino-quinase (porção que se liga ao ATP). A porção entre o domínio tirosino-quinase e a região transmembrana é chamada domínio juxta-membrana, sendo responsável por regular a atividade enzimática do domínio tirosino-quinase. A porção extra-celular da molécula contém cinco domínios imunoglobulinas-like; dois destes domínios estão envolvidos na ligação da KIT com seu ligante, SCF (BLECHMAN et al., 1993).

Um dos objetivos primordiais do tratamento quimioterápico é encontrar um meio seletivo para a administração de drogas, que atue com maior especificidade na célula tumoral, aumentando com isso seus efeitos anti-neoplásicos, mas minimizando, no entanto, os efeitos tóxicos nas células normais. Na última década, testemunha-se a

emergência do conceito de terapias direcionadas e da farmacogenética, em que drogas são selecionadas com base em anormalidades moleculares específicas, para o tratamento de determinadas doenças. A inter-relação entre a ativação de mutações *c-kit* e doenças humanas torna a KIT um alvo terapêutico atraente para o desenvolvimento de drogas inibidoras da atividade tirosino-quinase (HEINRICH et al, 2002). Imatinib³ (ou STI571) é o primeiro inibidor seletivo do receptor KIT tirosino-quinase aprovado para doenças humanas e é considerado um marco na terapia contra o câncer. O STI571 também inibe a proteína de fusão Bcr-Abl e o receptor tirosino-quinase de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-r) (CAPDEVILLE e SILBERMAN, 2003).

Em 1998, RICOTTI et al, relatam resultados indicando que o tumor de Ewing e o tumor neuroectodérmico primitivo (PNET) expressam *c-kit* e seu ligante SCF, e que este último é capaz de proteger as células tumorais contra apoptose. As análises de RT-PCR feitas nas 13 biópsias de tumor e nas linhagens celulares revelaram a presença de RNA mensageiro de SCF e do *c-kit* em todas as amostras estudadas.

SMITHEY et al, em 2002, apresentam dados da expressão de *c-kit* em pacientes com tumores pediátricos, dentre eles, o osteossarcoma. Foram estudados 151 tumores primários, sendo destes 18 osteossarcomas. Quinze de 18 (83%) osteossarcomas mostram positividade para *c-kit*. Em sete dos 18 tumores (39%), a positividade é de moderada a forte, e difusa. Doze de 15 (80%) casos *c-kit* positivos apresentam padrão de coloração citoplasmático e 13% deles, padrão membranoso. Seus achados sugerem que este tumor apresenta um padrão semelhante àquele visto no GIST, com positividade para *c-kit* difusa e forte; necessitando de futuras investigações nesta importante via tirosino-quinase e os efeitos do STI571 em modelos destes tumores para preparação de estudos clínicos em humanos.

³

Glivec® desenvolvido por Novartis (Basel, Suíça).

SCOTLANDI et al, em 2003, estudam o papel prognóstico e terapêutico do receptor *c-kit* no sarcoma de Ewing. Analisam 101 biópsias de sarcoma de Ewing (ES) através de imunohistoquímica, encontrando o percentual de 30% de pacientes expressando *c-kit* no tumor primário. Não encontram uma associação significativa entre o prognóstico clínico e a expressão do receptor. Demonstram uma inibição limitada à exposição do STI571 na linhagem celular ES, que apresenta altos níveis de *c-kit*. Sua conclusão é que a super-expressão de *c-kit* pode ser dispensável ao desenvolvimento do sarcoma de Ewing e não constitui um alvo terapêutico importante, mas, ainda assim, naqueles pacientes que demonstram altos níveis da expressão de *c-kit*, a atividade da droga pode ser explorada em combinação com a terapia convencional.

KOMDEUR et al, em 2003, relatam um estudo da expressão de KIT em sarcomas em campo previamente irradiados. Neste estudo, são incluídos angiossarcomas, fibrohistiocitoma maligno, osteossarcoma, fibrossarcoma, rabdomiossarcoma, e sarcomas inespecíficos. A expressão de KIT foi demonstrada através das técnicas de imunohistoquímica e sequenciamento de DNA (para análise do exon 11 do gene *c-kit*). Dezesesseis pacientes são incluídos no estudo. Quatorze destes casos apresentam o *c-kit* positivo (88%). Nestes dados, a maioria dos pacientes analisados mostra extensa expressão da proteína KIT, mas nenhuma mutação no exon 11 do gene *c-kit* é documentada. Ainda assim, estes tumores mostram-se potencialmente tratáveis com o inibidor KIT, mesilato de imatinib, de acordo com o autor.

YOSHITANI et al, em 2003, estudam a linhagem celular do osteossarcoma e do fibrohistiocitoma maligno de ratos. Este estudo sugere que o inibidor de tirosino-quinase STI571 possui um papel no bloqueio ou retardo da taxa de crescimento das células de osteossarcoma e de fibrohistiocitoma maligno, que expressam tipos de receptores tirosino-quinase.

2.2.5 P53:

A proteína p53 é descrita em 1979 por DE LEO et al. Em 1981, DIPOLD et al, observam uma super-expressão do *p53* em ratos e em tumores humanos. Inicialmente, acreditava-se que o *p53* possuía atividade oncogênica, funcionando como um proto-oncogene. Somente 10 anos depois, em 1989, FINLAY et al, BAKER et al e HINDS et al, demonstram que as propriedades oncogênicas do *p53* são devidas a mutações deste gene. Pesquisas subsequentes revelam ser o *p53*, de fato, um gene supressor de tumor.

LI e FRAUMENI, em 1982, descrevem, pela primeira vez, uma síndrome caracterizada pela maior ocorrência de cânceres familiares, incluindo, também, o osteossarcoma. Estes autores correlacionam o aparecimento dos cânceres familiares à presença de mutações no gene supressor *p53* nas células germinativas, considerado por alguns como guardião do genoma humano.

A proteína p53 é um dos três membros da família das proteínas: p53, p63 e p73. Todas as três proteínas podem induzir o processo de apoptose. Entretanto, raramente ocorrem mutações nas proteínas p63 e p73 em tumores humanos, tornando a proteína p53 de maior valor nas pesquisas de neoplasias humanas (DONEHOWER et al., 1992).

O gene *p53* localiza-se no braço curto do cromossomo 17, banda 17p13, um local freqüente de perda de alelos em osteossarcomas. Consiste em 11 exons, e codifica uma fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos com 53 Kda (MASUDA et al., 1987; TOGUUCHIDA, 1992; UEDA, 1993).

Na ausência de fatores de estresse, as atividades do *p53* pró-apoptóticas e supressoras de crescimento são inibidas pelo *MDM-2*, que se liga ao *p53* e regula negativamente as suas atividades (VASSILEV, 2004).

As mutações no *p53* têm sido encontradas em 50% dos tumores em humanos e têm sido associadas a diversos tipos de neoplasias em órgãos como cólon, pulmão, fígado, esôfago e mama (BARTEK et al., 1991). A mutação deste gene é considerada a alteração mais comum encontrada em tumores malignos humanos (LONARDO et al., 1997).

Durante o processo de tumorigênese, danos no gene *p53* são alterações das mais freqüentemente observadas. A proteína *p53* modula as funções celulares como transcrição gênica, síntese de DNA, reparo do DNA, parada do ciclo celular, senescência e apoptose programada. As mutações do gene *p53* podem resultar em uma alteração da função da proteína, disfunção, esta, relacionada à progressão tumoral e à instabilidade gênica (FRIDMAN e LOWE, 2003).

Outra proteína importante envolvida na via de regulação do *p53* é a *p14*, produto do gene *INK4A*, que é o mesmo gene produtor da proteína *p16* envolvida na via RB (retinoblastoma). A proteína *p14* exerce efeito protetor ao *p53*, ligando-se ao *MDM-2* (RAGLAND et al., 2002).

A ativação do gene *p53* resulta na parada do ciclo celular em G1 ou na indução de apoptose, dependendo principalmente do dano celular e da sua possibilidade de reparo celular. De acordo com pesquisas de DONEHOWER et al, em 1992, de DENG et al, 1995 e de SCHMITT et al, em 2002, o papel central do gene *p53* como supressor de tumor deve-se muito mais à habilidade de induzir morte celular, do que à parada do ciclo celular. O papel inibitório da proteína *p53* no crescimento celular tem sido ligado à

sua habilidade de estimular a transcrição de um inibidor ciclina-dependente (CDK), o *p21* (LONARDO et al., 1997).

MASUDA et al, em 1987, bem como MILLER et al., em 1990, e GOKGOZ et al., em 2001, já mostram alterações estruturais maiores no gene *p53* em 20% dos osteossarcomas. Alterações do gene *p53* têm sido encontradas em amostras de tecidos de osteossarcomas com uma frequência variando de 18-42% (TOGUUCHIDA et al., 1992; UEDA et al., 1993; MOUSSES et al., 1996).

TOGUUCHIDA et al, em 1992 e GOKGOZ et al, em 2001, observam que mutações do gene *p53* são freqüentes nas células de osteossarcomas humanos.

TOGUUCHIDA et al, em 1992, analisam novas mutações na linhagem germinativa do gene *p53* em sarcomas “esporádicos”, dentre eles, o osteossarcoma. De 196 pacientes com sarcoma, oito pacientes apresentam mutações na linhagem germinativa deste gene, sendo que três destes casos não possuíam história familiar conhecida de câncer e os cinco outros casos não têm história familiar ou pessoal usual de câncer. Concluem que estas mutações são raras, mas podem ser comuns em pacientes com sarcoma e com uma história anterior ou familiar de neoplasias primárias múltiplas. Este grupo portador de mutações do *p53* em linhagem germinativa parece ser mais diverso que o sugerido pela definição clínica de síndrome de Li-Fraumeni e a identificação destes portadores pode ser de substancial importância clínica.

MILLER et al, em 1996, avaliam alterações do *p53* em 42 pacientes com osteossarcoma e encontram uma positividade de 19 casos, dos quais 14 são mutações e cinco, rearranjos. A maioria das alterações do gene *p53*, neste estudo, ocorrem no exon 7 e 8, especialmente no códon 282.

HASEGAWA et al, em 1997, analisam 30 casos de osteossarcoma e observam a expressão da proteína *p53* em 20% dos casos. De acordo com seus achados, concluem

que alterações do gene *p53* podem fazer parte do processo de transformação neoplásica e de proliferação dos osteossarcomas, já que os tumores *p53*-positivos deste estudo são histologicamente de alto grau e que a imuno-localização é semelhante à imunopositividade ao PCNA.

LONARDO et al, em 1997, examinam 83 amostras de osteossarcomas, por imunohistoquímica de tecido parafinado, encontrando 26,5% (22/83) de positividade nos casos observados. Concluem que alterações nas vias *p53*/MDM2 ocorrem em um terço dos casos de osteossarcoma, e que sua significância prognóstica ainda necessita ser determinada em outros estudos.

ALVES, em 1998, apresenta um estudo de 60 casos de osteosarcoma no Brasil. A imuno-expressão da proteína *p53* (clone D07) se deu em 64,4%. A imuno-expressão positiva para *p53* não se correlacionou ao óbito ou probabilidade de metástase. Houve, porém, neste estudo, uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão de *p53* e c-erbB-2.

GOTO et al, em 1998, relatam que alterações no locus do *p53* podem apresentar significância prognóstica, visto que estas mudanças indicariam uma sensibilidade a agentes quimioterápicos. Neste estudo, são avaliados 32 casos de osteossarcoma clássico. A perda de heterozigosidade do gene *p53* é vista em 54% (13/24). Destes, 15% são sensíveis à quimioterapia pré-operatória, comparados a 64% dos tumores sem esta alteração.

VOGELSTEIN, em 2000, demonstra que níveis de *p53* aumentam substancialmente após estresse celular causado por radiação ionizante, radiação ultravioleta, hipóxia, ativação de oncogene e pelo uso de drogas citotóxicas. Este aumento dos níveis protéicos de *p53* deve-se a uma elevação da estabilidade desta proteína,

consequência de fosforilação e da reduzida interação com a proteína MDM-2, que normalmente se liga ao p53 para sua degradação (SLEE et al., 2004).

PATÍÑO-GARCIA et al, em 2003, avaliam alterações genéticas e epigenéticas dos reguladores do ciclo celular e genes supressores de tumor em osteossarcomas pediátricos. Estes autores analisam alterações do *RBI*, *TP53*, *p16INK4* e *p21WAF1*. É encontrada perda de heterozigotidade em 42,3% de *TP53* e 39% de mutações de *TP53*. As mutações de *TP53* estão associadas com idade mais tardia ao diagnóstico. Concluem que o *TP53*, bem como *RBI* e possivelmente outros genes supressores de tumor estão envolvidos na carcinogênese do osteossarcoma pediátrico, juntamente com outras alterações genéticas.

PAKOS et al., em 2004, em publicação de meta-análise, demonstram que alterações do gene *TP53* podem estar associadas à diminuição da sobrevida global de pacientes portadores de tumores ósseos.

VASSILEV et al, em 2004, identificam o primeiro potente e seletivo inibidor da ligação p53-MDM2, o Nutlins. Esta molécula ativa a via p53 e suprime o crescimento tumoral *in vivo* e *in vitro*, podendo representar uma arma importante contra aqueles tumores com p53 positivos.

WUNDER et al., em 2005, realizam um estudo prospectivo multicêntrico, com 196 pacientes com osteossarcoma não-metastático de extremidades envolvidos. Os tumores foram analisados para a presença de mutações de *p53* pelo método de PCR e análise direta do sequenciamento de DNA. A idade do paciente foi o único fator que variou com o status de *p53*. Na análise multivariada, o volume tumoral (≥ 9 cm) e a resposta histológica pobre à quimioterapia pré-operatória ($\geq 90\%$ necrose) foram os fatores significativos independentes de prognóstico sistêmico.

2.2.6 MDM-2:

O “murine double minute clone 2”, também chamado, gene *MDM-2* é originalmente descrito por CAHILLY-SNYDER et al, em 1987. FAKHARZADEH et al., em 1991, demonstram que quando um clone de *MDM-2* é amplificado em células de roedores, isto confere um alto potencial tumorigênico ao rato, de modo a sugerir que o *MDM-2* seja um oncogene.

Este gene codifica uma proteína de 90 Kda que se liga à proteína p53, e inibe a atividade transcricional do *p53*. Localiza-se no cromossomo 12, na região 12q13-15, que além do gene *MDM2*, também contém os genes *CDK4* e *SAS* (NILBERT et al., 1995; RAGAZZINI et al., 1999).

MOMAND et al., em 1992, reportam que este oncogene tem como principal função o controle da taxa de degradação da proteína p53 das seguintes formas: aumentando a susceptibilidade proteolítica do *p53* e ligando-se à proteína p53, formando um complexo, impedindo a transativação p53-mediada de diversos genes que regulam a parada do ciclo celular. Até o momento, têm sido demonstrados três eventos pós-translacionais que afetam a formação do complexo MDM2-p53: fosforilação, oligomerização e ligação com outras proteínas. A fosforilação de locais nos domínios da interação MDM2-p53 modula a formação deste complexo. A oligomerização do p53 afeta a sua ligação à proteína MDM2, alterando a conformação do domínio de ligação da proteína MDM2 na p53. Finalmente, as proteínas supressoras de tumor p19^{Arf}/p14^{Arf} ligam-se à proteína MDM2 e inibem a sua habilidade de regular a p53 (MOMAND, 2000).

Subseqüentemente, MOMAND et al, em 2000, demonstram que a super-expressão do gene *MDM2* inativa a função do gene supressor de tumor *p53*. *MDM2* e *p53* estão envolvidos numa alça de “feedback” negativos. Nesta alça, o *p53* ativa o *MDM2*, que, por sua vez, regula negativamente o *p53*.

A amplificação do *MDM-2* foi descrita em sarcomas humanos. Como o *MDM2* exerce uma importante função no controle da atividade de *p53*, os tumores que apresentam amplificação do gene *MDM2* não necessitam de mutações do *p53* (MOMAND, 2000).

OLINER et al, em 1992, mostram que o gene *MDM-2* encontra-se amplificado em 30% dos osteossarcomas por eles estudados.

LADANYI et al, em 1993, examinam uma possível correlação entre *MDM2* e osteossarcoma de alto grau de 28 amostras de 26 pacientes (16 primários, 11 metastáticos e 1 recidiva local), utilizando análise de Southern blot para amplificação do gene. Quatro amostras (14%) indicam amplificação, incluindo três metástases e uma recaída local. Nesta série, a amplificação do gene *MDM2* é detectada significativamente mais freqüentemente em osteossarcomas metastáticos ou recorrentes do que nas osteossarcomas primários, sugerindo que a amplificação do *MDM2* possa estar associada com progressão tumoral e metástases ao diagnóstico.

NAKAYAMA et al., em 1995, estudam a amplificação do gene *MDM2* em tumores ósseos e de partes moles. Foram encontradas três amplificações em 67 osteossarcomas. Todas as amplificações foram encontradas em lesões primárias de osteossarcomas (3/49), por sua vez, nenhuma o foi em lesões metastáticas (0/18).

MILLER et al, em 1996, examinam alterações nos genes *p53*, *Rb* e *MDM2* em tumores de 68 pacientes, incluindo 42 com osteossarcoma. O *MDM2* é analisado em 37 amostras de pacientes com osteossarcoma. Um aumento do número de cópias do gene

MDM2 é detectado em nove pacientes. Neste estudo, 60% das amostras têm alterações do *p53* e/ou *Rb*, enfatizando a importância destes genes nos sarcomas.

LONARDO et al, em 1997, inclui 83 amostras de 80 pacientes com osteossarcoma (59 tumores primários, três recaídas e 24 metastáticos). Destes, 73 puderam ser estudados para amplificação pela análise de Southern blot. Cinco casos (6,6%) são positivos para amplificação. Concluem que estes achados na via *p53/MDM2* ocorrem em um terço dos casos de osteossarcoma, com provável significância prognóstica.

RAGAZZINI et al, em 1999, analisam alterações genômicas, como amplificação ou rearranjo, dos genes *SAS*, *MDM2* e *CDK4*, todos localizados na região q13-15 do cromossomo 12 e utilizam a técnica de imunohistoquímica para avaliar a expressão da proteína encontrada, em osteossarcomas centrais de baixo grau. A expressão da proteína *MDM2* é encontrada em 7 de 20 tumores (35%). De acordo com a análise gênica, 15% das amostras (3/20) mostram uma forte expressão de *MDM2*, bem como de *CDK4*. Este estudo demonstra que os osteossarcomas de baixo grau são, provavelmente, caracterizados por alteração nos múltiplos genes do segmento 12q13-15.

KAWAGUCHI et al., em 2002, realizam uma análise molecular dos genes *p53*, *MDM2* e *H-ras* em osteossarcomas e fibrohistiocitomas malignos ósseos de pacientes acima de 40 anos. Neste estudo, 23 casos de osteossarcomas são analisados para mutação do gene *p53*, amplificação do gene *MDM2* e mutação dos genes *H-ras*, usando a técnica de PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) e imunohistoquímica, para análise da expressão das proteínas *p53*, *MDM2* e *p21*. Três casos de osteossarcoma (13%) são positivos para *MDM2* e três casos demonstram amplificação do gene *MDM2*, mostrando correlação significativa da expressão da proteína e da amplificação do gene *MDM2*.

JUNIOR et al, em 2003, analisam achados clinico-patológicos e imunohistoquímicos de p53, MDM2, CDK4, PCNA e Ki67 em 25 osteossarcomas de cabeça e pescoço. A positividade de MDM2 neste estudo é de 24% e seus achados de significância prognóstica são a exposição prévia à radiação e o tipo histológico.

VASSILEV, em 2004, identifica o primeiro inibidor seletivo da ligação p53-MDM2, o Nutlins, ainda em fase experimental.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS:

3.1 CASUÍSTICA:

Foram estudados 43 casos de osteossarcomas, diagnosticados pelo Grupo de Oncologia Ortopédica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, do período de 2000 a 2004, tratados de acordo com o Protocolo Brasileiro Cooperativo de Tratamento de Tumores Ósseos (anexo 1).

3.2 MÉTODOS:

3.2.1 ASPECTOS CLÍNICOS:

Os seguintes aspectos clínicos foram analisados: idade ao diagnóstico, sexo, localização do tumor, presença ou não de metástase ao diagnóstico, tipo histológico, evolução clínica, recidiva local e/ou sistêmica, volume tumoral ao diagnóstico e resposta histológica à quimioterapia neo-adjuvante (HUVOS et al, 1977). A caracterização destes dados, bem como a avaliação de todos estes pacientes, são realizadas pela autora. Este estudo foi aprovado pela CAPPesq (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) em 2002 e todos os pacientes ou seus responsáveis foram devidamente informados dos objetivos deste estudo, bem como assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado previamente pela CAPPesq.

O volume tumoral ao diagnóstico foi medido através da ressonância nuclear magnética obtida ao diagnóstico. Foram realizadas medições dos três eixos (transversal, longitudinal e sagital) das maiores medidas tumorais, multiplicando-as por uma constante (0,52) para obter-se um volume em centímetros cúbicos que melhor se aproxima do volume tumoral real.

Dos quarenta e três casos estudados, a idade ao diagnóstico variou de 05 a 58 anos, com uma média de 17,2 anos e mediana de 16 anos (gráfico 1).

Quanto ao sexo, 17 pacientes eram do sexo feminino e 26 do sexo masculino (gráfico 2).

A frequência de casos com metástases ao diagnóstico foi de 41,9% (18/43). Os pacientes que não apresentavam metástases ao diagnóstico corresponderam a 58,1% do total de casos (25/43) (anexo 4).

A distribuição dos osteossarcomas segundo a localização óssea foi: 26 casos em fêmur distal, sete localizações em tíbia proximal, cinco acometimentos de úmero proximal, seguidos de dois casos em fíbula proximal, um caso em fêmur proximal, um caso em maxila e um em rádio distal. Houve um predomínio absoluto do comprometimento do membro inferior em relação ao membro superior e um predomínio dos ossos longos quando comparado ao esqueleto axial (tabela 2 e gráfico3).

LOCALIZAÇÃO	Frequência	Percentagem
fêmur dist	26	60.4
fêmur prox	1	2.3
fíbula prox	2	4.7
maxila	1	2.3
rádio dist	1	2.3
tíbia prox	7	16.3
úmero prox	5	11.6

Quanto à resposta histológica à quimioterapia pré-operatória, de acordo com os critérios de HUVOS, na amostra de 43 casos: 23 (53,5.0%) apresentavam HUVOS grau I e 7 (16.3%) HUVOS grau II. Os demais ou não fizeram cirurgia (5 casos-11,6%) ou foram a óbito pré-cirurgia (por toxicidade-4 casos; 9,3%) ou realizaram ressecção (conservadora ou amputação) pré-quimioterapia (4 casos; 9,3%).

As distribuições dos tumores segundo o subtipo histológico foi: (quadro 4)

Tipo histológico	n	%
Condroblástico	7	16,3
Epitelióide	1	2,3
Fibrohistiocítico	1	2,3
Interrogado (não classificado)	5	11,6
Misto	3	7,0
Osteoblástico	20	46,5
Parosteal grau III	2	4,7
Periosteal grau III	1	2,3
Rico em cels gigantes	1	2,3
Telangectásico	2	4,7
Total	43	100,0

Foram analisadas as curvas de sobrevida global (do momento do diagnóstico - data da biópsia - ao óbito, ou última data de seguimento) e as curvas de sobrevida livre de eventos (do momento da ressecção tumoral ao evento final – data da recidiva, óbito, ou última data de seguimento). A sobrevida global dos pacientes com osteossarcoma em 31 meses foi de 50% e a sobrevida livre de doença em 16 meses também se aproximou deste mesmo valor (GRÁFICO 4 e 5).

GRÁFICO 4:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global de todos os pacientes do estudo:

GRÁFICO 5:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida livre de doença dos casos do estudo:

Foram realizadas análises da sobrevida global e sobrevida livre de doença quanto ao sexo (gráfico 6 e 7), presença de metástases ao diagnóstico (gráficos 8 e 9), volume tumoral com ponto de corte de 150 ml (gráfico 10 e 11) e volume tumoral com ponto de corte na mediana dos valores dos volumes tumorais dos pacientes deste estudo (gráfico 12 e 13).

GRÁFICO 6:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro sexo:

GRÁFICO 7:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida livre de doença com parâmetro sexo:

GRÁFICO 8:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro metástases ao diagnóstico:

GRÁFICO 9:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida livre de doença com parâmetro metástases ao diagnóstico:

GRÁFICO 10:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro volume tumoral (= ou = que 150 ml) ao diagnóstico:

GRÁFICO 11:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro volume tumoral
(= ou > 150 ml) ao diagnóstico:

GRÁFICO 12:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro volume tumoral (calculado como ponto de corte a mediana dos valores dos volumes tumorais) ao diagnóstico:

GRÁFICO 13:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida livre de eventos com parâmetro volume tumoral (calculado como ponto de corte a mediana dos valores dos volumes tumorais) ao diagnóstico:

3.2.2 PARÂMETROS HISTOLÓGICOS E CLASSIFICAÇÃO:

O estudo anatomo-patológico para diagnóstico de osteossarcoma em materiais de biópsia ou peças cirúrgicas pré-quimioterapia, constou da análise de lâminas coradas pela hematoxilina-eosina. A análise das lâminas foi feita pelos patologistas do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os materiais analisados eram biópsias ou tumores recém-diagnosticados, sem tratamento quimioterápico prévio. Cada caso foi classificado por um patologista, em uma análise cega da identidade e situação clínica do paciente.

Estudo Imunohistoquímico

Cortes histológicos de quatro μm de espessura dos tumores emblocados em parafina foram submetidos ao estudo imunohistoquímico. Foram empregados os seguintes anticorpos: 1) para proteína TP53 (procedência: DAKO Corporation, Carpinteria, CA, EUA; clone DO-7, código:A310); 2) para o antígeno nuclear de proliferação celular PCNA (procedência: DAKO, Carpinteria, CA, EUA; clone: PC10, código: M879); 3) para a proteína c-kit (procedência: Santa Cruz Biotechnology, lote: D182, código: SC-168); 4) para a proteína erbB-2 (procedência: DAKO, Carpinteria, CA, EUA; código: A0485, lote: 035); 5) para proteína MDM-2 (procedência: Novo Castra, código: NCL-MDM2 IgM, lote: 114304 e 6) para Pgp-170 (procedência: Novo Castra, código: NCL-JSB1, lote: 200107).

A técnica detalhada do método imunohistoquímico empregado encontra-se no anexo 2. O espécime foi submetido à recuperação antigênica com o uso do calor, utilizando-se panela de pressão. Utilizaram-se os anticorpos acima descritos, avaliados em cortes histológicos em lâminas previamente silanizadas (3-aminopropyltriethoxysilane Sigma Chemical CO, EUA, código A3 648), deixadas em estufa a 60°C, por 24 horas, para maior adesão aos cortes. O método utilizado foi streptavidina-biotina-peroxidase para todos os anticorpos estudados. A reação de detecção foi realizada com o uso do "kit" DAKO StreptABComplex/HRP (estreptavidina-biotina-peroxidase) e LSAB que consiste nas seguintes etapas: 1) incubação com o anticorpo primário na diluição que será estabelecida previamente para cada anticorpo em TBS durante uma hora, a 37 °C, ou 18 horas, a 4 °C; 2) lavagem em TBS e incubação no mesmo tampão durante cinco minutos; 3) incubação com o anticorpo secundário biotinilado durante 30 minutos à temperatura ambiente e posterior lavagem com TBS; 4) incubação com o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase durante 30 minutos à temperatura ambiente; 5) lavagem e posterior incubação com TBS durante cinco minutos; 6) incubação com o substrato DAB (6 mg de tetrahydrocloridio de 3,3-diaminobenzidine em 10 ml de 0,05 M TBS, pH 7.6, e 0,1 ml de 3% H₂O₂) durante 5 minutos; 7) lavagem em água destilada; 8) contra-coloração com hematoxilina de Harrys; 9) montagem com gelatina glicerina.

Os anticorpos, origem e respectivos títulos estão demonstrados no quadro1.

A positividade da reação foi avaliada pela cor marrom, visualizada em microscopia óptica, representando o complexo antígeno-anticorpo formado, capaz de ligar o cromógeno. A imunohistoquímica foi avaliada de maneira quantitativa, contando-se 300 células num campo de 200 vezes de aumento, em que tumores foram

classificados como positivos ou negativos para os respectivos anticorpos, considerando-se positivos apenas os casos com imunorreatividade positiva em mais que 10% das células neoplásicas para todos os marcadores. Os marcadores p53, PCNA e MDM2 foram considerados positivos quando sua imunocoloração apresentava representação nuclear. Os marcadores c-KIT, p-glicoproteína e ErbB2 foram considerados positivos quando expressavam a coloração marrom num padrão citoplasmático ou membranoso.

Quadro 1: Especificações dos anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica e tipo de recuperação antigênica

ANTÍGENO	P53	PCNA	P-GP	MDM-2	C-kit	ErbB-2
ANTICORPO	Monoclonal Camundongo	Monoclonal Camundongo	Monoclonal Camundongo	Monoclonal Camundongo	Policlonal Coelho	Policlonal Coelho
CLONE	DO7	PC10	JBS1	1B10	-----	-----
PROCEDÊNCIA	DAKO	DAKO	Novocastra	Novocastra	Santa Cruz	DAKO
CÓDIGO	A310	M879	NCL-JSB1	NCL-MDM2 IgM	SC 168	A0485
DILUIÇÃO	1/100	1/2000	1/25	1/25	1/50	1/500
RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	Panela de pressão 5 min	Panela de pressão 5 min	Panela de pressão 5 min	Panela de pressão 5 min	Panela de pressão 5 min	Panela de pressão 5 min
AMPLIFICAÇÃO	Estreptavidina biotina- peroxidase (LSAB+)	Estreptavidina biotina- peroxidase (LSAB+)	Estreptavidina biotina- peroxidase (Duet)	Estreptavidina biotina- peroxidase (LSAB+)	Estreptavidina biotina- peroxidase (Duet)	Estreptavidina a biotina- peroxidase (LSAB+)

3.2.3 Análise Estatística:

Inicialmente, todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis quantitativas, esta análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvios-padrão e medianas. Para as variáveis qualitativas, calcularam-se frequências absolutas e relativas.

Para o estudo da associação entre duas variáveis foi utilizado o teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (quando ocorreram frequências esperadas abaixo de cinco) (ROSNER, 1986).

Para se avaliar o tempo até a ocorrência de eventos (óbito e recidivas), foram ajustadas curvas de Kaplan-Meier e estas foram testadas através do teste log-rank. Para o estudo de diversos fatores relacionados ao tempo de ocorrência de eventos, foi ajustado o modelo de regressão de Cox multivariado (GIESECKE, 1994).

O nível de significância utilizado para os testes foi de 5%.

4. RESULTADOS

4. **RESULTADOS:**

Os marcadores imunohistoquímicos revelaram as seguintes frequências:

- ErbB-2: mostrou-se positivo em 17,9% (7/39) das amostras e negativo em 82,1% (31/39) delas.
- P53: 23,1% (9/39) positividade dos casos estudados e 76,9% (30/39) de negatividade desses casos.
- PCNA: a análise das lâminas revela uma positividade de 71,4% (25/35) e uma negatividade de 28,6% (10/35).
- PGP: Foram positivos 40,5% (15/37) dos casos e 59,5%, negativos (22/37).
- C-kit: 67,6% positivos (25/37) e 32,4% negativos (12/37).
- MDM2: 34,8% positivos (8/23) e 65,2% negativos (15/23).

Da análise dos marcadores biológicos quanto à sobrevida total e livre de doença, destacou-se um resultado estatisticamente significativo com a expressão positiva de HER2 e p53, enquanto que os outros marcadores não demonstraram serem importantes no prognóstico destes pacientes. (GRÁFICO 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

GRÁFICO 10:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro ErbB2:

GRÁFICO 11:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida livre de doença com parâmetro ErbB2:

GRÁFICO 12:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro p53:

GRÁFICO 13:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida livre de doença com parâmetro p53:

GRÁFICO 14:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro PCNA:

GRÁFICO 15:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida livre de doença com parâmetro PCNA:

GRÁFICO 16:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro p-glicoproteína:

GRÁFICO 17:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida livre de doença com parâmetro p-glicoproteína:

GRÁFICO 18:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro c-KIT:

GRÁFICO 19:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida livre de doença com parâmetro c-KIT:

GRÁFICO 20:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida global com parâmetro MDM2:

GRÁFICO 21:

Curva de Kaplan-Meier analisando a sobrevida livre de doença com parâmetro MDM2:

Os resultados estatisticamente significantes, quando se comparam a presença de metástases ao diagnóstico e as diversas expressões das proteínas por imunohistoquímica, relacionara-se à expressão positiva de p53 (tabela3).

TABELA 5: ASSOCIAÇÃO DOS DIVERSOS MARCADORES COM METÁSTASE AO DIAGNÓSTICO

		Meta					
		Não			Sim		
Marcador		n	%		n	%	p ⁽¹⁾
ErbB2	Negativo	20	87,0		12	75,0	0,415
	Positivo	3	13,0		4	25,0	
P 53	Negativo	21	91,3		9	56,3	0,019
	Positivo	2	8,7		7	43,8	
PCNA	Negativo	6	30,0		4	26,7	1,000
	Positivo	14	70,0		11	73,3	
PGP	Negativo	12	54,5		10	66,7	0,461 ₍₂₎
	Positivo	10	45,5		5	33,3	
C Kit	Negativo	8	34,8		4	28,6	1,000
	Positivo	15	65,2		10	71,4	
MDM 2	Negativo	9	69,2		6	60,0	0,685
	Positivo	4	30,8		4	40,0	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

(2): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

Ao analisar os marcadores biológicos e a relação entre eles, temos que: há uma associação estatisticamente significativa entre a presença de ErbB2 e de p53 (tabela 4) entre a de p53 e de PCNA (tabela 5), e entre a de c-KIT e de p-glicoproteína (tabela 6). As demais relações não se mostraram estatisticamente importantes (tabelas 7, 8).

TABELA 6: ASSOCIAÇÃO DOS DIVERSOS MARCADORES E METÁSTASE AO DIAGNÓSTICO COM ERBB2:

		ErbB2					
		Negativo			Positivo		
Marcador		n	%		n	%	p ⁽¹⁾
Meta	Não	20	62,5		3	42,9	0,415
	Sim	12	37,5		4	57,1	
P 53	Negativo	28	87,5		2	28,6	0,004
	Positivo	4	12,5		5	71,4	
PCNA	Negativo	10	34,5		0	0,0	0,152
	Positivo	19	65,5		6	100,0	
PGP	Negativo	20	66,7		2	28,6	0,095
	Positivo	10	33,3		5	71,4	
C Kit	Negativo	10	33,3		2	28,6	1,000
	Positivo	20	66,7		5	71,4	
MDM 2	Negativo	12	70,6		3	50,0	0,621
	Positivo	5	29,4		3	50,0	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

(2): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

TABELA 7: ASSOCIAÇÃO DOS DIVERSOS MARCADORES E METÁSTASE AO DIAGNÓSTICO COM P53

		P 53				
		Negativo		Positivo		
Marcador		n	%	n	%	p ⁽¹⁾
Meta	Não	21	70,0	2	22,2	0,019
	Sim	9	30,0	7	77,8	
ErbB2	Negativo	28	93,3	4	44,4	0,004
	Positivo	2	6,7	5	55,6	
PCNA	Negativo	10	38,5	0	0,0	0,036
	Positivo	16	61,5	9	100,0	
PGP	Negativo	19	67,9	3	33,3	0,118
	Positivo	9	32,1	6	66,7	
C Kit	Negativo	9	32,1	3	33,3	1,000
	Positivo	19	67,9	6	66,7	
MDM 2	Negativo	12	70,6	3	50,0	0,621
	Positivo	5	29,4	3	50,0	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

(2): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

TABELA 8: ASSOCIAÇÃO DOS DIVERSOS MARCADORES E META COM PGP

Marcador		PGP				p ⁽¹⁾
		Negativo		Positivo		
		n	%	n	%	
Meta	Não	12	54,5	10	66,7	0,461 ⁽²⁾
	Sim	10	45,5	5	33,3	
ErbB2	Negativo	20	90,9	10	66,7	0,095
	Positivo	2	9,1	5	33,3	
P 53	Negativo	19	86,4	9	60,0	0,118
	Positivo	3	13,6	6	40,0	
PCNA	Negativo	6	31,6	2	14,3	0,416
	Positivo	13	68,4	12	85,7	
C Kit	Negativo	10	47,6	1	6,7	0,011
	Positivo	11	52,4	14	93,3	
MDM 2	Negativo	8	72,7	7	58,3	0,667
	Positivo	3	27,3	5	41,7	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

(2): nível descritivo de probabilidade do teste Qui-quadrado

TABELA 9: ASSOCIAÇÃO DOS DIVERSOS MARCADORES COM PCNA

Marcador		PCNA				p ⁽¹⁾
		Negativo		Positivo		
		n	%	n	%	
PGP	Negativo	6	75,0	13	52,0	0,416
	Positivo	2	25,0	12	48,0	
C Kit	Negativo	3	33,3	9	37,5	1,000
	Positivo	6	66,7	15	62,5	
MDM 2	Negativo	1	100,0	10	55,6	1,000
	Positivo	0	0,0	8	44,4	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

TABELA 10: ASSOCIAÇÃO C KIT COM MDM2:

Marcador		C Kit				p ⁽¹⁾
		Negativo		Positivo		
		n	%	n	%	
MDM 2	Negativo	3	60,0	12	66,7	1,000
	Positivo	2	40,0	6	33,3	

(1): nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

Tanto para a curva de sobrevida global, como para a de livre de eventos, as variáveis analisadas de forma multivariada foram aquelas que se mostraram estatisticamente significantes na análise univariada: metástase ao diagnóstico, Erb-2 e p53. Observamos que o parâmetro metástase (p: 0,0276 SLD e p: 0,0413) é o único estatisticamente significativo na análise multivariada pelo modelo de regressão de Cox, tanto para sobrevida livre de doença, quanto para sobrevida global.

Curva de COX para sobrevida livre de eventos

		Total	Eventos	% de			
		39	18	Censurados	Censurados		
				21	53.85		
Variável	gl	Parâmetro Estimado	Erro padrão	Qui-quadrado de Wald	p	Razão de risco	
META3	1	1.298672	0.58933	4.85600	0.0276	3.664	
C_ERB1	1	0.552067	0.63433	0.75745	0.3841	1.737	
P_532	1	0.786531	0.67238	1.36837	0.2421	2.196	

Curva de COX para sobrevida global

		Total	Eventos	% de		Censurados
		39	18	21		53.85
Variável	gl	Parâmetro	Estimado	Erro	Qui-quadrado	Razão
				padrão	de Wald	de risco
META3	1	1.169997	0.57341	4.16331	0.0413	3.222
C_ERB1	1	0.120146	0.68534	0.03073	0.8608	1.128
P_532	1	1.029040	0.71721	2.05858	0.1514	2.798

FIGURAS:

Figura 1: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão nuclear, PCNA (200x). (Caso 11125546)

Figura 2: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão nuclear, PCNA (200x), matriz cartilaginosa. (Caso 1112627)

Figura 3: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão nuclear, MDM2 (200x). (Caso 1112538)

Figura 4: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão nuclear, MDM2 (200x). (Caso 1100718)

Figura 5: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão nuclear, MDM2 (200x). (Caso 1116746)

Figura 6: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão membranoso, c-KIT (200x). (Caso 1112295)

Figura 7: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão membranoso, c-KIT (200x). (Caso 1112627)

Figura 8: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão membranoso, c-KIT (200x). (Caso 1112546)

Figura 9: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão membranoso, c-KIT (100x). (Caso 1121383)

Figura 10: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão membranoso, c-KIT (200x). (Caso 1121383)

Figura 11: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão membranoso, p-glicoproteína (200x). (Caso 1119788)

Figura 12: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão membranoso, p-glicoproteína (200x). (Caso 1004182)

Figura 13: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão membranoso, ErbB-2 (400x). (Caso 1100718)

Figura 14: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão membranoso, ErbB-2 (200x). (Caso 1121383)

Figura 15: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão nuclear, p53 (200x). (Caso 1100718)

Figura 16: Imuno-marcação positiva nas células neoplásicas, padrão nuclear, p53 (400x). (Caso 1121383)

5. DISCUSSÃO

5. **DISCUSSÃO:**

Os resultados obtidos no presente estudo não puderam ser comparados com dois fatores de prognóstico consagrados na literatura: o volume tumoral ao diagnóstico (HUDSON et al., 1990; PETRILLI et al., 1991; BIELING et al., 1996; SAETER et al., 1997; FERRARI et al., 2001) e a resposta histológica à quimioterapia pré-operatória (HUDSON et al., 1990; PETRILLI et al., 1991; DAVIS et al., 1994; SAETER et al., 1997; BACCI et al., 2002; RECH et al., 2004). Isto se deve ao fato de que na nossa casuística todos os tumores observados eram maiores que 150 cm³ (exceção dos casos 5, 12, 15, 19, 24, 30, 31 e 39- anexo 3), ponto de corte da maioria dos trabalhos previamente descritos. Além disso, todos os nossos casos obtiveram graus de necrose I e II de acordo com os critérios descritos por HUVOS et al, em 1977, portanto, maus respondedores à quimioterapia adotada pelo Protocolo Brasileiro de Tratamento dos Tumores Ósseos.

Não houve significância estatística do valor prognóstico do volume tumoral no nosso estudo. Foi realizado um novo corte para análise do volume tumoral, utilizando a mediana encontrada em todos os valores de tamanho tumoral ao diagnóstico. Ainda assim, não foi encontrada significância estatística deste parâmetro. Sobre este fator em nossa casuística, pode-se especular tanto que o grande volume tumoral observado na maioria dos nossos pacientes ao diagnóstico decorreria de uma demora na procura de serviços de saúde quaternários, passíveis de diagnosticar e tratar esta população; como ainda que, no País, poderia se verificar uma biologia mais agressiva dos tumores, ainda pouco estudados sob o ponto de vista biológico.

Todos os nossos pacientes são considerados maus respondedores da quimioterapia instituída pré-operatória do protocolo multiinstitucional utilizada em nosso Serviço. Conjectura-se, neste sentido, o real valor dos critérios adotados por HUVOS, e utilizados na grande maioria das instituições que tratam tumores ósseos, nos casos que chegam aos serviços quaternários no Brasil. É importante lembrar que os critérios de resposta à quimioterapia pré-operatória serão analisados num âmbito distinto, com um maior número de casos, posteriormente, com os dados do Protocolo Brasileiro de Tratamento de Tumores Ósseos-2000, avaliando-se o seu valor prognóstico para os tumores brasileiros.

Em nosso estudo, a p-glicoproteína (Pgp) não se mostrou um marcador biológico que pudesse ser utilizado como fator de prognóstico. Nenhuma análise estatística revelou a importância deste marcador como fator de prognóstico. Sua positividade foi de 40,5% (15/37). A positividade da expressão de Pgp pela técnica de imunohistoquímica em outros estudos variou de 30-67% (BALDINI et al., 1995; ALVES, 1998; PARK et al., 2001; HORNICEK et al., 2000; SERRA et al., 2003; FERRARI et al., 2004), condizendo com os achados do nosso estudo.

Outros estudos, diferentemente do quanto aqui constatado, indicam uma correlação entre a expressão de Pgp e pior prognóstico. PAKOS e IOANNIDIS, em 2002, realizam uma meta-análise da associação de Pgp com resposta à quimioterapia neoadjuvante e com o prognóstico clínico em pacientes com osteossarcoma. Concluem que a positividade de Pgp não está associada à resposta histológica, mas há uma forte correlação entre positividade de Pgp e progressão de doença. Também foram correlacionados o aumento de Pgp e o pior prognóstico clínico nos estudos de BALDINI et al., em 1995, HORNICEK et al., em 2000, e SERRA et al., em 2003.

SCOTLANDI et al., em 1996, refutam os resultados dos autores acima, sugerindo que o fenótipo MDR não está associado a um comportamento agressivo e à habilidade de metastatização das células. Segundo este autor, o prognóstico desfavorável destes pacientes mais provavelmente se relacionaria à menor resposta às drogas citotóxicas. FERRARI et al., em 2004, demonstram que houve aumento da positividade de Pgp em metástases pulmonares, em relação ao tumor primário. Os achados contraditórios destes dois últimos estudos podem estar relacionados com as diferentes técnicas utilizadas.

O nosso estudo não consegue evidenciar uma correlação entre a expressão de Pgp e o prognóstico, assim como os estudos de ALVES, em 1998, e de WUNDER, em 2000, que analisam a expressão do gene *MDR1*, o primeiro, através da técnica de imuno-histoquímica, enquanto o segundo, mediante a técnica de RT-PCR.

PARK et al., em 2000, estudam a co-expressão da proteína p53 e da Pgp. Concluem que estas expressões concomitantes são fortes indicadores de curta sobrevida pela análise multi-variada. Em nossos resultados, não houve significância estatística entre as positivities destas duas proteínas e um pior prognóstico. O número de casos de ambos os estudos foi semelhante, bem como a técnica utilizada.

O PCNA, conforme já demonstrado em outros estudos (GARCIA et al., 1989; CHANO et al., em 1996), mostrou-se um marcador importante para avaliação de proliferação celular. Indica, com sensibilidade, um aumento no “turn-over” das células tumorais. A positividade nuclear das células de osteossarcoma em nosso estudo foi de 71,4% de todos os pacientes estudados.

Não houve correlação estatisticamente significativa entre a presença de PCNA positivo e a positividade de outros marcadores biológicos estudados. Tampouco a presença da referida proteína trouxe indicações estatísticas relevantes, quando relacionada à sobrevida livre de eventos, à sobrevida global ou à metástase ao diagnóstico. Nos estudos de ALVES, em 1998, e JUNIOR et al, em 2002, não foi encontrada correlação entre a presença do PCNA e a piora do prognóstico dos pacientes. Tampouco nos estudos de KAKAR et al (2000) observou-se qualquer correlação entre necrose tumoral e positividade do PCNA.

Diferentemente dos nossos achados, HASEGAWA et al (1997), encontra uma correlação entre o número de células PCNA-positivas e o grau histológico. Também OLIVEIRA (2002) sugere em seu trabalho que a presença de PCNA poderia estar relacionada com a resistência ao tratamento quimioterápico.

A positividade da proteína MDM-2 neste estudo foi de 34,8%. OLINER et al., em 1992, também encontra em seu estudo 30% de positividade, em concordância com os nossos achados. RAGAZZINI et al, em 1999, analisa a amplificação ou o rearranjo do gene *MDM2* e também sua expressão imunohistoquímica. A expressão da proteína MDM-2, naquele estudo, foi de 35%, também concordante com a positividade da nossa pesquisa.

No trabalho de LADANYI et al, em 1993, 14% das amostras apresentam amplificação do oncogene *MDM-2*. Aquele estudo, entretanto, foi realizado com a técnica de Southern-blot para análise da expressão gênica, diferente do presente trabalho, que examinou a expressão protéica do gene, razão pela qual diferenças percentuais são possíveis. Isto porque a presença da proteína pode ocorrer não somente

em virtude da amplificação do oncogene, mas, também, como um evento pós-transcricional e pós-traducional. Aquele mesmo estudo aponta que a amplificação do *MDM2* pode estar associada à progressão tumoral e à metástase ao diagnóstico, diferentemente dos achados do nosso estudo, que não mostrou significância estatística da presença de MDM-2 nem sua correlação com o prognóstico ou metástases ao diagnóstico. De novo, estas discordâncias entre os dois estudos podem resultar do fato de que o nosso estudo fundamenta-se na expressão protéica e o estudo de LADANYI, na expressão gênica.

Em contrapartida, KAWAGUCHI et al., em 2002, mostram correlação significativa da expressão da proteína e da amplificação do gene *MDM2*. Em seu trabalho, 13% dos casos de osteossarcomas apresentam imuno-marcação positiva para MDM-2 na análise imunohistoquímica e 13% demonstram amplificação do oncogene *MDM-2*. Este estudo, entretanto, foi realizado com um número pequeno de casos (23). Também foi realizado apenas com osteossarcomas de baixo grau, o que nos impede de compará-lo com os nossos achados.

Também NAKAYAMA et al., em 1995, MILLER et al, em 1996, e LONARDO et al, em 1997, estruturam seus estudos na amplificação gênica do *MDM-2*, o que não permite sua comparação com o nosso estudo em termos de números percentuais.

Em nosso estudo, houve uma positividade de 23,1% de casos expressando a proteína p53. PARK et al., em 2001, utiliza o mesmo anticorpo usado por nós para avaliar a expressão de p53 (DO-7), bem como a mesma classificação de positividade (>10%). Ainda assim, seus achados diferem significativamente com relação à positividade de p53: encontram 63% de positividade. Os nossos resultados convergem

com os achados da maioria dos trabalhos realizados (MASUDA et al., 1987; MILLER et al., 1990; MILLER et al., 1996; LONARDO et al., 1997, e GOKGOZ et al., 2001).

Foi possível observarmos uma significância estatística entre a positividade da expressão de p53 e metástases ao diagnóstico, bem como uma correlação entre a sobrevida livre de eventos e a sobrevida global com a positividade do p53. Dos casos que apresentavam metástases ao diagnóstico, 43,8% expressavam p53 positivo, enquanto dos que não apresentavam metástases, apenas 8,7% têm p53 positivo.

PAKOS, em 2004, em uma meta-análise, não observa associação entre o status de p53 e a resposta histológica à quimioterapia, mas sugere que alterações no gene *p53* possam estar associadas à diminuição da sobrevida. Os nossos achados convergem com a meta-análise acima citada e com outros estudos anteriores, visto que nos resultados deste estudo a sobrevida livre de doença e também a sobrevida global apresentam uma correlação estatisticamente significativa com a presença de metástase ao diagnóstico.

Outro resultado estatisticamente significativo obtido nesta análise foi a correlação entre a presença de ErbB2 nas amostras estudadas e uma menor sobrevida global e livre de eventos. ONDA et al, 1996, GORLICK et al, em 1999, MORRIS et al, em 2001, e ZHOU, em 2003, já haviam demonstrado em seus estudos uma significância prognóstica da amplificação do gene *ErbB2*, através de técnicas de Southern blot, da análise de polimorfismo gênico por RT-PCR e da imunohistoquímica.

Em contrapartida, KILPATRICK et al, em 2001, refutam os achados dos estudos anteriores, não encontrando positividade membranosa no seu estudo. MAITRA et al, em 2001, também não encontram positividade de suas amostras pela técnica de imunohistoquímica, além de não observarem amplificação do gene *ErB2* na técnica de FISH, concluindo que este achado seria um evento incomum nos osteossarcomas pediátricos. Também THOMAS et al, em 2002, demonstram uma ausência de expressão

do HER2/*neu* em osteossarcoma e concluem que o HER2/*neu* não é expresso por estes sarcomas, e, portanto, não seria um fator de prognóstico importante. Tanto KILPATRICK et al (2001), quanto THOMAS et al (2002) e ANNINGA et al (2004) questionam o valor da positividade citoplasmática da proteína ErbB2, já que esta é uma tirosino-quinase expressa na membrana plasmática e seu modelo em mama só é considerado positivo quando há uma positividade forte do padrão membranoso. Em contrapartida, outros autores, como ONDA et al (1996), GORLICK et al (1999), MORRIS et al (2001) e ZHOU et al (2003), mostraram uma positividade de até 40%, incluindo o padrão citoplasmático nestas amostras positivas e conseguiram demonstrar um valor prognóstico relacionado a esta expressão. O nosso estudo considerou positivas as amostras que expressavam um padrão citoplasmático, levando em consideração que ainda não há consenso na literatura em relação ao padrão para osteossarcoma e à dificuldade na descalcificação das amostras ósseas. ALVES (1998), em seu estudo, utiliza o mesmo anticorpo usado em nosso trabalho. No entanto, sua avaliação da positividade e da imuno-expressão foi semi-quantitativa, com a utilização de escores de 0 a 3 (positivos naqueles acima de 25%), não tendo sido descrito, em seu estudo, se houve consideração dos pacientes que expressavam imuno-marcação citoplasmática.

A positividade das amostras estudadas neste estudo para a proteína ErbB2 foi de 17,9%, que poderiam ser alvo de terapia imunológica anti-HER2 com transtuzumab, num estudo posterior.

Observamos também uma positividade de c-kit em 67,6% das amostras (25/37), o que nos leva a sugerir que este pode ser um alvo para futuras terapias utilizando-se o STI-571. MERCHANT et al, em 2002, verificam que o imatinib interfere no crescimento de todas as linhagens celulares de sarcoma de Ewing testadas *in vivo* e *in vitro*, podendo, uma inibição das alças autócrinas tirosino-quinase-

dependentes, ser uma estratégia terapêutica viável para o tratamento do sarcoma de Ewing. SCOTLANDI et al, em 2003, estudam a expressão de c-Kit em sarcoma de Ewing e demonstram, numa análise de 101 amostras, que não há associação entre a expressão do receptor c-Kit e o prognóstico clínico destes pacientes. Sugerem, porém, que naqueles que apresentam altos níveis de expressssão c-Kit, este novo alvo terapêutico poderá ser utilizado em combinação com as drogas convencionais. Neste estudo, as amostras eram consideradas positivas quando eram coradas difusamente, podendo ser classificadas em fortemente positivas ou fracamente positivas. GONZALEZ et al., em 2004, analisam o impacto *in vitro* do bloqueio de KIT pelo imatinib nas linhagens celulares do Sarcoma de Ewing. Concluem que a inibição de KIT aumenta a sensibilidade destas células à doxorrubicina e à vincristina, demonstrando um potencial papel do mesilato de imatinib no tratamento do Sarcoma de Ewing. Não existem estudos na literatura mostrando a eficácia do imatinib em osteossarcoma, nem tampouco apontando a positividade da expressão da proteína c-Kit em osteossarcoma. Os estudos acima sugerem, em outro tumor ósseo muito freqüente na adolescência, o Sarcoma de Ewing, que pode haver um papel potencial do inibidor de tirosino-quinase nos tumores que expressam a proteína c-Kit.

Poucos autores enfatizaram a presença da expressão de c-Kit em osteossarcoma. SMITHEY et al, em 2002, avaliam a presença de positividade desta proteína em vários tumores pediátricos, dentre eles, o osteossarcoma. Neste estudo a positividade foi de 83% (15/18), com 39% destes, moderado ou fortemente positivos e 13% exibindo um padrão membranoso. Mais recentemente, YOSHITANI et al, em 2003, estudam a inibição do crescimento de osteossarcomas em linhagem celular de rato e sugerem que o inibidor de tirosino-quinase STI571 pode ter algum benefício no

bloqueio ou retardo da taxa de crescimento de células de osteossarcoma que expressam receptores tipo tirosino-quinase.

Vale ressaltar a diferença metodológica aplicada nos diversos estudos que utilizaram a técnica de imunohistoquímica. O método utilizado para a técnica de imunohistoquímica é semelhante em todos os estudos, através do procedimento biotina-avidina-peroxidase. No entanto, os anticorpos por vezes são diferentes, o que pode resultar em diferenças de resultados.

Na análise multivariada, os marcadores imunohistoquímicos acima estudados perdem seu valor prognóstico em decorrência de uma variável mais importante, a presença de metástases macroscópicas ao diagnóstico. Ainda assim, é importante realçar a importância destas proteínas na tumorigênese e na agressividade de certos tumores, que poderiam levar, através de diversas vias, à disseminação do tumor e a conseqüentes metástases à distância. Torna-se importante a realização de estudos voltados a demonstrar as vias pelas quais estes genes ou suas proteínas poderiam influenciar na metastização dos sarcomas osteogênicos e a contribuição, através de terapias-alvo, na melhora da sobrevida destes pacientes.

CONSIDERAÇÕES GERAIS:

A positividade de c-Kit nas nossas amostras não demonstrou diferença estatisticamente significativa que pudesse ser considerada de valor prognóstico. Porém, é importante considerar a alta taxa de positividade deste marcador biológico nestas amostras (67,6%), o que nos leva a refletir sobre a possibilidade de nortear futuros ensaios clínicos incluindo o uso de imatinib em pacientes com osteossarcoma refratário que expressem c-Kit na sua análise imunohistoquímica.

6. CONCLUSÃO

6. **CONCLUSÃO:**

- A expressão de HER2 em osteossarcoma associou-se a um pior prognóstico, com diminuição da sobrevida global e livre de eventos e com a presença de metástases ao diagnóstico, podendo ser considerada como indicador biológico de prognóstico neste estudo, pela análise univariada.
- A positividade do p53 correlaciona-se à presença de metástases ao diagnóstico, concluindo-se que o p53 participa do processo de tumorigênese e que este marcador é indicador de pior prognóstico, pela análise univariada.
- Na análise multivariada, o único fator de prognóstico significativo foi a presença de metástases ao diagnóstico, conduzindo à conclusão que a presença de mutações na proteína p53 ou a presença da expressão de ErbB-2 participam no processo de tumorigênese e possuem implicação no prognóstico destes pacientes. No entanto, a presença de metástases ao diagnóstico é, indubitavelmente, seu fator de prognóstico inquestionável.

7. BIBLIOGRAFIA

7. **BIBLIOGRAFIA:**

AKIN C, METCALFE DD. The Biology of kit in disease and the application of pharmacogenetics. *J Allergy Clin Immunol* 114(1):13-9, 2004.

ALROY I, YARDEN Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FBES Letters* 410:83-6, 1997.

ALVES MTS. *Correlação clínico-anátomo-patológico e imuno-histoquímico de marcadores de agressividade tumoral no osteossarcoma* (tese). São Paulo: Universidade Federal de Medicina, Escola Paulista de Medicina; 1998.

ANNINGA JK, VAN DE VIJVER MJ, CLETON-JANSEN AM, KRISTEL PMP, TAMINIAU AHM, NOOIJ M, EGELER RM, HOGENDOORN PCW. Overexpression of the *Her2* oncogene does not play a role in high-grade osteosarcomas. *European Journal of Cancer* 40:963-70, 2004.

ARICO M, VALSECCHI MG, CAMITTA B et al. Outcome of treatment in children with philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 342:998-1006, 2000.

BACCI G, PICCI P, FERRARI S et al. Primary chemotherapy and delayed surgery for non metastatic osteosarcoma of the extremity. Results in 164 patients preoperatively treated with high doses of methotrexate, followed by cisplatin and doxorubicin. *Cancer* 72:3227-38, 1993.

BACCI G, MERCURI M, BRICCOLI A, FERRARI S, BERTONI F, DONATI D, MONTI C, ZANONI A, FORNI C, MANFRINI M. Osteogenic sarcoma of the extremity with detectable lung metastases at presentation. Results of treatment of 23 patients with chemotherapy followed by simultaneous resection of primary and metastatic lesions. *Cancer* 15;79(2):245-54, 1997.

BACCI G, FERRARI S, BERTONI F et al. Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at Istituto Ortopedico Rizzoli according to the Istituto Ortopedico Rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol* 18:4016-27, 2000.

BACCI G, LONGHI A, FERRAI S, LARI S, MANFRINI M, DONATI D, FORNI C, VERSARI M. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase in osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: recent experience at Rizzoli Institute. *Oncology Reports* 9(1):171-5, 2002.

BAKER JS, FEARON ER, NIGRO JM, HAMILTON SR, PREISINGER AC, JESSUP JM, VAN TUINEN P, LEDBETTER DH, BARKER DF, NAKAMURA Y, WHITE R, VOGELSTEIN B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244:217-21, 1989.

BALDINI N, SCOTLANDI K, BARBANTI-BRODANO G et al. Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *N Engl J Med* 333: 1380-5, 1995.

BALDINI N, SCOTLANDI K, SERRA M et al. P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy. *J orthop Res* 17: 629-32, 1999.

BARTEK J, BARTKOVA J, VOJTESEK B, STASKOVA Z, LUKAS J, REJTHAR A, KOVARIK J, MIDGLEY CA, GANNON JV, LANE DP. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6:1699-703, 1991.

BASELGA J. Herceptin® alone or in combination with chemotherapy in the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer: pivotal trials. *Oncology* 61(Suppl 2):14-21, 2001.

BORRELLO MG, BONGARZONE I, PIEROTTI M, LUKSCH R, GASPARINI M, COLLINI P, PILOTTI S, RIZZETTI MG, MONDELLINI P, DEBERNARDI B, DIMARTINO D, GARAVENTA A, BRISGOTTI M,

TONINI GP. TRK and RET protooncogene expression in human neuroblastoma specimens: high-frequency of trk expression in non-advanced stages. *Int J Cancer* 54:540-5.1993.

BRAVO R, FRANK R, BLUNDELL PA, MACDONALD BRAVO H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 326:515-7,1987.

BIELING P, REHAN N, WINKLER P et al. Tumor size and prognosis in aggressively treated osteosarcoma. *J Clin Oncol* 14:848-58, 1996.

BLECHMAN JM, LEV S, BRIZZI MF, LEITNER O, PEGORARO L, GIVOL D et al. Soluble c-kit proteins and antireceptor monoclonal antibodies confine the binding site of the stem cell factor. *J Biol Chem* 268:4399-406, 1993.

BRAMWELL VHC, BURGERS M, SNEATH R et al. A comparison of two short intensive adjuvant chemotherapy regimens in operable osteosarcoma of limbs in children and young adults: The first study of the European Osteosarcoma Intergroup. *J Clin Oncol* 10:1579-91, 1992.

BRAMWELL VH: The role of chemotherapy in the management of non-metastatic operable extremity osteosarcoma. *Semin Oncol* 24:561-71, 1997.

BRODEUR GM, SEEGER RC, SCHWAB M et al. Amplification of *n-myc* in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224:1121-4, 1984.

BRODEUR GM, AMBROS PF. Genetic and biological markers of prognosis in neuroblastoma. In: Brodeur, GM, Sawada, T, Tsuchida, Y & Voute, P. *Neuroblastoma*. Elsevier Science B.V., 1^a edição, 2000, pp:355-69.

CAHILLY-SNYDER L, YANG-FENG T, FRANCKE U, GEORGE DL. Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. *Somatic Cell & Molecular Genetics* 13(3):235-44, 1987.

CAMPANACCI M, BACCI G, BERTONI F, PICCI P, Minutillo A, Franceschi C. The treatment of osteosarcoma of the extremities: twenty year's experience at the Istituto Ortopedico Rizzoli. *Cancer* 48(7):1569-81, 1981.

CAMPOS L, GUYOTAT D, ARCHIMBAUD E et al. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 79:473-6, 1992.

CAPDEVILLE R, SILBERMAN S. Imatinib: a targeted clinical drug development. *Semin Hematol* 40:15-20, 2003.

CHAN HSL, THORNER PS, HADDAD G, LING V. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: Prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J Clin Oncol* 8:689-704,1990.

CHAN HSL, HADDAD G, THORNER PS et al. P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N Engl J Med* 325:1608-14,1991.

CHAN HS, GROGAN TM, HADDAD G et al. P-glycoprotein expression: Critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 89:1706-15, 1997.

CHANO T, MATSUMOTO K, ISHIKAWA M, MORIMOTO S, HUKUDA S, OKABE H, KATO H, FUJINO S. Analysis of the presence of osteoclastin, S-100 protein, and proliferating cell nuclear antigen in cells of various types of osteosarcomas. *Eur J Histochem* 40(3):189-98, 1996.

COHEN PS, CHAN JP, LIPKUNSKAYA M, BIEDLER JL, SEEGER RC. Expression of stem cell factor and c-kit in human neuroblastoma. *Blood* 84(10):3465-72, 1994.

CORTES EP, HOLLAND JF, WANG JJ et al. Doxorubicin in disseminated osteosarcoma. *J Am Méd Assoc* 221:1132-8, 1972.

COUSSENS L, YANG-FENG TL, LIAO YC, CHEN E, GRAY A, MCGRATH J, SEEBURG PH, LIBERMANN TA, SCHLESSINGER J, FRANCKE U et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230(4730):1132-9, 1985.

DAHLIN DC, COVENTRY MB. Osteogenic sarcoma: A study of six hundred cases. *J Bone Joint Surg Am* 49:101-10, 1967.

DAHLIN DC, UNNI KK. *Bone tumors. General aspects and data on 11,087 cases*. Philadelphia: Lippincott-Raven: 5th ed, 1996.

DAVIS AM, BELL RS, GOODWIN PJ. Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review. *J Clin Oncol* 12:423-31, 1994.

DE LEO AB, JAY G, APPELLA E, DUBOIS GC, LAW L, OLD LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci* 76(5):2420-24, 1979.

DeMATTEO RP. The GIST of targeted cancer therapy: a tumor (gastrointestinal stromal tumor), a mutated gene (c-kit), and a molecular inhibitor (STI571). *Ann Surg Oncol* 9(9):831-9, 2002.

DENG C, ZHANG P, HARPER JW, ELLEDGE SJ, LEDER P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82 (4):675-84, 1995.

Detailed Guide: Osteosarcoma What Are The Key Statistics About Osteosarcoma? [online]. Revisado em 29/08/2003. Disponível em: http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1X_What_are_the_key_statistics_for_osteosarcoma_52.asp?sitearea. Acesso em 08 nov. 2004.

DIPPOLD WG, JAY G, DE LEO AB, KHOURY G, OLD LJ. p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(3):1695-99, 1981.

DONEHOWER LA, HARVEY M, SLAGLE BL, MCARTHUR MJ, MONTGOMERY JR CA, BUTEL JS, BRADLEY A Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 356:215-21, 1992.

DORFMAN HD, CZERNIAK B. Bone Cancers. *Cancer* 75:203-210, 1995.

ENNEKING WF, SPANIER SS, GOODMAN MA. Current concepts review. The surgical satging of musculoskeletal sarcoma. *J Bone Joint Surg Am* 62(6):1027-30, 1980.

FAIRMAN MP. DNA polymerase delta/PCNA: actions and interactions. *J Cell Sci* 95:1-4,1990.

FAKHARZADEH SS, TRUSKO SP, GEORGE DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* 10(6):1565-9, 1991.

FERRARI S, MERCURI M, PICCI P et al. Nonmetastatic osteosarcoma of the extremity: Results of a neoadjuvant chemotherapy protocol (IOR/OS-3) with high-dose methotrexate, intraarterial or intravenous cisplatin, doxorubicin, and salvage chemotherapy based on histologic tumor response. *Tumori* 85:458-64, 1999.

FERRARI S, BERTONI F, MERCURI M, PICCI P, GIACOMINI S, LONGHI A, BACCI G. Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: an analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute. *Annals of Oncology* 12(8):1145-50, 2001.

FERRARI S, BERTONI F, ZANELLA L, SETOLA E, BACHINNI P, ALBERGHINI M, VERSARI M, BACCI G. Evaluation of p-glycoprotein, HER-2/ErbB-2, p53, and Bcl-2 in primary tumor and metachronous lung metastases in patients with high-grade osteosarcoma. *Cancer* 100(9):1936-42, 2004.

FINLAY CA, HINDS PW, LEVINE AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57 (7):1083-93, 1989.

FRIDMAN JS, LOWE SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22:9030-40, 2003.

FUCHS N, BIELACK SS, EPLER D et al. Long-term results of the cooperative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group's protocol COSS-86 of intensive multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs. *Ann Oncol* 9: 893-9, 1998.

GALAND P, DEGRAEF C. Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. *Cell Tissue Kinet* 22:383-92, 1989.

GARCIA RL, COLTRERA MD, GOWN AM. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am J Pathol* 134(4):733-9, 1989.

GEORGES E, BRADLEY G, GARIEPY J. Detection of P-glycoprotein isoforms by gene specific monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:152-6,1990.

GIESECKE J. – *Modern Infectious Disease Epidemiology* – Editora Arnold, London, Treat Britain:251, 1994.

GLASSER DB, LANE JM, HUVOS AG et al. Survival, prognosis and therapeutic response in osteogenic sarcoma. *Cancer* 69:698-708, 1992.

GOKGOZ N, WUNDER JS, MOUSSES S et al. Comparison of p53 mutations in patients with localized osteosarcoma and metastatic osteosarcoma. *Cancer (Phila)* 92:2181-9, 2001.

GOLDSTEIN LJ, FOJO AT, UEDA K et al. Expression of the multidrug resistance, *MDR1* gene in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 8:128-36,1990.

GONZALEZ I, ANDREU EJ, PANIZO A, INOGÉS S, FONTALBA A, FERNANDEZ-LUNA JL, GABOLI M, SIERRASESUMAGA L, MARTIN-ALGARRA S, PARDO J, PROSPER F, ALAVA E. Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis. *Clinical Cancer Research* 10: 751-61, 2004.

GORLICK R, HUVOS AG, HELLER G, ALEDO A, BEARDSLEY GP, HEALEY JH, MEYERS PA. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 17(9):2781-8, 1999.

GOTO A, KANDA H, ISHIKAWA Y, MATSUMOTO S, KAWAGUCHI N, MACHINAMI R, KATO Y, KITAGAWA T. Association of loss of heterozygosity at the p53 locus with chemoresistance in osteosarcomas. *Jpn J Cancer Res* 89:539-47, 1998.

HARRIS MB, GIESER P, GOORIN AM, AYALA A, SHOCHAT SJ, FERGUSON WS, HOLBROOK T, LINK MP. Treatment of metastatic osteosarcoma at diagnosis: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 16(11):3641-8, 1998.

HASEGAWA T, HIROSE T, SEKI K, HIZAWA K, ISHII S, WAKABAYASHI J-I. Histological and immunohistochemical diversities, and proliferative activity and grading in osteosarcomas. *Cancer Detect Prev* 21(3):280-7, 1997.

HEINRICH MC, BLANKE CD, DRUKER BJ, CORLESS CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment kit-positive malignancies. *J Clin Oncol* 20(6):1692-703, 2002.

HINES SJ, ORGAN C, KORNSTEIN MJ, KRYSTAL GW. Co-expression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ* 6(6):769-79, 1995.

HINDS P, FINLAY C, LEVINE AJ. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J. Virol.* 63(2):739-46, 1989.

HIROTA S, ISOZAKI K, MORIYAMA Y et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279:577-80, 1998.

HORNICEK FJ, GEBHARDT MC, WOLFE MW, KHARRAZI D, TAKESHITA H, PAREKH SG, ZURAKOWSKI D, MANKIN HJ. P-glycoprotein levels predict poor outcome in patients with osteosarcoma. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 373:11-7, 2000.

HUDSON M, JAFFE MR, JAFFE N, AYALA A, RAYMOND K, CARRASCO H, WALLACE S, MURRAY J, ROBERTSON R. Pediatric osteosarcoma: therapeutic strategies, results, and prognostic factors derived from 10-year experience. *J Clin Oncol* 8:1988-97, 1990.

HUGHES DPM, THOMAS DG, GIORDANO TJ, BAKER LH, McDONAGH KT. Cell Surface Expression of Epidermal Growth Factor Receptor and Her-2

with Nuclear Expression of Her-4 in Primary Osteosarcoma. *Cancer research*, 64:2047-53, 2004.

HUVOS AG, ROSEN G, MARCOVE RC. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy, en bloc resection and prosthetic bone replacement. *Arch Pathol Lab Med* 101:14-18, 1977.

HYNES NE, STERN DF. The biology of *erbB-2/neu/HER-2* and its role in cancer. *Biochem Biophys Acta Rev Cancer* 1198:165-84, 1994.

JAFFE N, FREI E, TRAGGIS D, WATTS H. Weekly high-dose methotrexate-citrovorum factor in osteogenic sarcoma. *Cancer* 39:45-50, 1977.

JAFFE N, FREI E, WATTS H, TRAGGIS D. High dose methotrexate in osteogenic sarcoma: a 5-year experience. *Cancer Treatment Rep* 62:259-64, 1978.

JUNIOR AT, DE ABREU ALVES F, PINTO CA, CARVALHO AL, KOWALSKI LP, LOPES MA. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of twenty-five head and neck osteosarcomas. *Oral Oncology* 39(5):521-30, 2003.

KAKAR S, MIHALOV M, CHACHLANI NA, GHOSH L, JOHNSTONE H. Correlation of c-fos, p53, and PCNA expression with treatment outcome in osteosarcoma. *J Surg Oncol* 73(2):125-6, 2000.

KAWAGUCHI K, ODA Y, SAKAMOTO A, SAITO T, TAMIYA S, IWAMOTO Y, TSUNEYOSHI M. Molecular analysis of p53, MDM2, and H-ras genes in osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma of bone in patients older than 40 years. *Mod Pathol*.15(8):878-88, 2002.

KILPATRICK SE, GEISINGER KR, KING TS, SCIARROTTA J, WARD WG, GOLD SH, BOS GD. Clinicopathologic analysis of HER-2/neu immunoexpression among various histologic subtypes and grades of osteosarcoma. *Mod Pathol* 14(12):1277-83, 2001.

KOMDEUR, R; HOEKSTRA, HJ; MOLENAAR, WM; VAN DEN BERG, E; ZWART, N; PRAS, E; PLAZA-MENACHO, I; HOFSTRA, RMW; VAN DER GRAAF, WTA. Clinicopathologic assessment of postradiation sarcomas: KIT as a potential treatment target. *Clin Cancer Research* 9:2926-32, 2003.

KONDOH G, HAYASAKA N, LI Q et al. Na in vivo model for receptor tyrosine kinase autocrine/paracrine activation: auto-stimulated Kit receptor acts as a tumor promoting factor in papillomavirus-induced tumorigenesis. *Oncogene* 10:341-7, 1995.

KRYSTAL GW, HINES SJ, ORGAN CP. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by co-expression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Research* 56(2):370-6, 1996.

KURKI P, OGATA K, TAN EM. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as a probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J Immunol Methods* 109:49-59,1988.

LADANYI M, CHA C, LEWIS R, JHANWAR SC, HUVOS AG, HEALEY JH. *MDM2* gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Research* 53:16-8, 1993.

LI FP, FRAUMENI JF. Prospective study of a cancer family syndrome. *JAMA* 247:2692-4, 1982.

LINK MP, GOORIN AM, HOROWITZ M et al. Adjuvant chemotherapy of high grade osteosarcoma of the extremity. Updated results of the Multi-institutional Osteosarcoma Study. *Clin Orthop* 270:8-14, 1991.

LINK MP, GEBHARDT MC, EILBER F. Osteosarcoma. In: Pizzo, PA; Poplack, DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 4th Edition, 2002. p. 889-920.

LLOMBART-BOSCH A, NAVARRO S. Immunohistochemical Detection of EWS and FLI-1 Proteins in Ewing Sarcoma and Primitive Neuroectodermal Tumors: Comparative Analysis with CD99 (MIC-2) Expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9(3): 255-60, 2001.

LONARDO F, UEDA T, HUVOS AG, HEALEY J, LADANYL M. P53 e MDM-2 alterations in osteosarcomas. Correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. *Cancer* 79(8): 1541-7, 1997.

MAITRA A, WANZER D, WEINBERG AG, ASHFAQ R. Amplification of HER-2/*neu* oncogene is uncommon in pediatric osteosarcomas. *Cancer* 92(3):677-83, 2001.

MARCOVE RC, MIKE V, HAJEH JV et al. Osteosarcoma under the age of twenty-one: a review of one hundred and forty-five operative cases. *J Bone Joint Surg* 52: 411-23, 1970.

MASUDA H, MILLER C, KOEFFLER HP, BATTIFORA H, CLINE MJ. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7716-9, 1987.

MEYERS PA, HELLER G, HEALY J et al. Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: The Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol* 10:5-15, 1992.

MEYERS PA, GORLICK R: Osteosarcoma. *Pediatr Clin North Am* 44:973-90, 1997.

MEHLMAN CT. Osteosarcoma. In: eMedicine-Osteosarcoma [online].
Revisado em 26/02/2002. Disponível em:
<http://www.emedicine.com/orthoped/topic531.htm>.

MERCHANT MS, WOO G-W, MACKALL CL, THIELE CJ. Potential use of imatinib in Ewing's sarcoma: evidence for in vitro and in vivo activity. *Journal of the National Cancer Institute* 94(22):1673-9, 2002.

MERTENS F, MANDAHN N, ORNDAL C, BALDETORP B, BAUER HC, RYDHOLM A, WIEBE T, WILLIEN T, AKERMAN M, HEIM S, MITELMAN F. Cytogenetic findings in 33 osteosarcomas. *Int J Cancer* 55:44-50, 1993.

MILLER CW, ASLO A, TSAY C, SLAMON D, ISHIZAKI K, TOGUUCHIDA J, YAMAMURO T, BEATRICE L, KOEFFLER HP. Frequency and structure of p53 rearrangements in human osteosarcoma. *Cancer Res* 50: 7950-4, 1990.

MILLER CW, ABDULKARIM A, WON A, TAN M, LAMPKIN B, KOEFFLER HP. Alterations of the *p53*, *Rb* and *MDM2* genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 122:559-65, 1996.

MIYACHI K, FRITZLER MJ, TAN EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121:2228-34, 1978.

MOMAND J, ZAMBETTI GP, OLSON DC, GEORGE D, LEVINE AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69(7):1237-45, 1992.

MOMAND J, WU H-H, DASGUPTA G. MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242:15-29, 2000.

MORRIS CD, GORLICK R, HUVOS AG, HELLER G, MEYERS PA, HEALEY JH. Human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic indicator in osteogenic sarcoma. *Clin Orthop* 1(328):59-65, 2001.

MOUSSES S, MCAULEY L, BELL RS, KANDEL R, ANDRULIS IL. Molecular and immunohistochemical identification of p53 alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Mod Pathol* 9:1-6, 1996.

NAKAYAMA T, TOGUCHIDA J, WADAYAMA B, KANOE H, KOTOURA Y, SASAKI MS. MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with tumor progression in differentiated adipose-tissue tumors. *Int J Cancer* 64(5):342-6, 1995.

NILBERT M, RYDHOLM A, MITELMAN F et al. Characterization of the 12q13-15 amplicon in soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 83:32-36, 1995.

NG WF, SARANGI F, ZASTAWNY RL, VEINOT-DREBOT L, LING V. Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. *Mol Cell Biol* 9:1224-30, 1989.

OLINER JD, KINZLER KW, MELTZER PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358(6381):80-3, 1992.

OLIVEIRA CRGCM. *Osteblastomas atípicos: estudo de fatores biológicos na sua relação com os osteblastomas clássicos e com os osteossarcomas* (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

ONDA M, MATSUDA S, HIGAKI S, LIJIMA T, FUKUSHIMA JI, YOKOKURA A, KOJIMA T, HORIUCHI H, KUROKAWA T, YAMAMOTO T. ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer* 77:71-8, 1996.

PAKOS EE, IOANNIDIS JP. The Association of P-Glycoprotein with Response to Chemotherapy and Clinical Outcome in Patients with Osteosarcoma. *Cancer* 98(3):581-7, 2003.

PAKOS EE, KYZAS PA, IOANNIDIS JPA. Prognostic significance of *TP53* tumor supressor gene expression and mutations in human osteosarcoma: a meta-analyses. *Cinical Cancer Research* 10:6208-14, 2004.

PARK H-R, PARK Y-K. Expression of p53 protein, PCNA, and ki-67 in osteosarcomas of bone. *Journal of Korean Medical Science* 10(5):360-7, 1995.

PARK YB, KIM HS, OH JH, LEE SH. The co-expression of p53 protein and P-glycoprotein is correlated to a poor prognosis in osteosarcoma. *International Orthopaedics* 24:307-10, 2001.

PASTAN I, GOTTESMAN MM. Multiple-drug resistance in human cancer. *N Engl J Med* 316:1388-93, 1987.

PATÍÑO-GARCIA A, PIÑEIRO EL, DÍEZ MZ, ITURRIAGAGOITIA LG, KLUSSMANN FA, ARIZNABARRETA LS. Genetic and epigenetic alterations of the cell cycle regulators and tumor supressor genes in pediatric osteosarcomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 25(5):362-7, 2003.

PETRILLI AS, GENTIL FC, EPELMAN S et al. Increased survival, limb preservation, and prognostic factors for osteosarcoma. *Cancer* 68:733-7, 1991.

PETRILLI AS, MACEDO CRD, SOUZA GA, ODONE FILHO V, MACHADO TMS, BRUNETTO AL, BRUNIERA P, CAMARGO B, ALVES MTS, PROSPERO D, OLIVEIRA CRGCM, PENNA V, CAMARGO OP, GARCIA RJ. Experiência de osteossarcoma no Brasil de 1991 a 1999 [anais em CD-ROM]. In: *IX Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica*; 2004; São Paulo.

PIETSCH T, KYAS U, STEFFENS U, YAKISAN E, HADAM MR, LUDWIG WD, ZSEBO K, WELTE K. Effects of human stem cell factor (c-kit ligand) on proliferation of myeloid leukemia cells: Heterogeneity in response and synergy with other hematopoietic growth factors. *Blood* 80(5):1199-206, 1992.

PROVISOR AJ, ETTINGER LJ, NACHMAN JB et al. Treatment of nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with preoperative and postoperative chemotherapy: a report from Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* 15:76-84, 1997.

RAGAZZINI P, GAMBERI G, BENASSI MS, ORLANDO C, SESTINI R, FERRARI C, MOLENDINI L, SOLAZZO MR, MERLI M, MAGAGNOLI G, BERTONI F, BOHLING T, PAZZAGLI M, PICCI P. Analysis of SAS gene and CDK4 and MDM2 proteins in low-grade osteosarcoma. *Cancer Detect Prev* 23(2):129-36, 1999.

RAGLAND BD, BELL WC, LOPEZ RR, SIEGAL GP. Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma. *Lab Invest* 82(4):365-73, 2002.

RIORDAN JR, DEUCHARS K, KARTNER N. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316:817-20, 1985.

RECH A, CASTRO JUNIOR CG, MATTEI J et al. Clinical features in osteosarcoma and prognostic implications. *J Pediatr (Rio J)* 80(1):65-70, 2004.

RICOTTI E, FAGIOLI F, GARELLI E, LINARI C, CRESCENZIO N, HORENSTEIN AL, PISTAMIGLIO P, VAI S, BERGER M, MONTEZEMOLO LC, MADON E, BASSO G. c-kit is expressed in soft tissue sarcoma of neuroectodermic origin and its ligand prevents apoptosis of neoplastic cells. *Blood* 91(7):2397-405, 1998.

ROBBINS BA, VEJA DD, OGATA K, TAN EM, NAKAMURA RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med* 111:841-5, 1987.

ROSEN G, MURPHY ML, HUVOS AG, Gutierrez M, Marcove RC. Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer* 37(1):1-11, 1976.

ROSEN G, MARCOVE RC, CAPARROS B, NIRENBERG A, KOSLOFF C, HUVOS AG. Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer* 43(6):2163-77, 1979.

ROSEN G, MARCOVE RC, HUVOS AG, CAPARROS BI, LANE JM, NIRENBERG A, CACAVIO A, GROSHEN S. Primary osteogenic sarcoma: eight-year experience with adjuvant chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 106 Suppl:55-67, 1983.

ROSNER B. - *Fundamentals of Biostatistics* - Boston, PWS Publishers, Second edition:584, 1986.

RUBIN I, YARDEN Y. The basic biology of HER2. *Annals of Oncology* 12 (Suppl 1): 3-8, 2001.

SAETER G, ELOMAA I, WAHLQVIST Y et al. Prognostic factors in bone sarcomas. *Acta Orthop Scand* (Suppl 273) 68:156-60, 1997.

SAKAYAMA K, FUJIBUCHI T, KIDANI T, MIYAZAKI T, YAMAMOTO H. Proliferative activity of osteosarcoma cells: comparison of osteoblastic and nonosteoblastic regions. *J Orthop Sci* 8:678-82, 2003.

SCHAJOWICZ F, SISSONS HA, SOBIN LH. The World Health Organization's Histologic Classification of Bone Tumors. A Commentary on the Second Edition. *Cancer*, 75:1208-1214, 1995.

SCHMITT CA, FRIDMAN JS, YANG M, BARANOV E, HOFFMAN RM, LOWE SW. Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* 1(3):289-98, 2002.

SCOTLANDI K, SERRA M, NICOLETTI G, VACCARI M, MANARA MC, NINI G, LANDUZZI L, COLACCI A, BACCI G, BERTONI F, PICCI P, CAMPANACCI M, BALDINI N. Multidrug Resistance and Malignancy in Human Osteosarcoma. *Cancer Research* 56:2434-9, 1996.

SCOTLANDI K, MANARA MC, SERRA M et al. The expression of P-glycoprotein is casually related to a less aggressive phenotype in human osteosarcoma cells. *Oncogene* 18: 739-46,1999.

SCOTLANDI K, MANARA MC, STRAMMIELLO R, LANDUZZI L, BENINI S, PERDICHIZZI S, SERRA M, ASTOLFI A, NICOLETTI G, LOLLINI P-L, BERTONI F, NANNI P, PICCI P. *C-kit* receptor expression in

Ewing's sarcoma: lack of prognostic value but therapeutic targeting opportunities in appropriate conditions. *J Clin Oncol* 21(10):1952-60, 2003.

SERRA M, SCOTLANDI K, REVERTER-BRANCHAT G, FERRARI S, MANARA MC et al. Value of P-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities. *J Clin Oncol* 21(3):536-542, 2003.

SLEE EA, O'CONNOR DJ, LU X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 23:2809-18, 2004.

SMITHEY BE, PAPPO AS, HILL DA. C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. *Am J surg Pathol* 26(4):486-92, 2002.

SOUHAMI RL, CRAFT AW, VAN DER EIJKEN JW et al. Randomized trial of two regimens of chemotherapy in operable osteosarcoma: A study of the European Osteosarcoma Intergroup. *Lancet* 350: 911-7, 1997.

TAYLOR WF, IVINS JC, DAHLIN DC et al. Osteogenic sarcoma experience at the Mayo Clinic. *Progr Cancer Res Ther* 6:257-69, 1978.

THOMAS DG, GIORDANO TJ, SANDERS D, BIERMANN JS, BAKER L. Absence of HER2/*neu* gene expression in osteosarcoma and skeletal Ewing's sarcoma. *Clin Cancer Research* 8:788-93, 2002.

TOGUCHIDA J, YAMAGUCHI T, RITCHIE B, BEAUCHAMP RL, DAYTON SH, HERRERA GE, YAMAMURO T, KOROURA Y, SASAKI MS, LITTLE JB, WEICHSELBAUM RR, ISHIZAKI K, YANDELL DW. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Research* 52: 6194-9, 1992.

TOGUCHIDA J, YAMAGUCHI T, DAYTON SH, BEAUCHAMP RL, HERRERA GE, ISHIZAKI K, YAMAMURO T, MEYERS PA, LITTLE JB; SASAKI MS, WEICHSELBAUM RR, YANDELL DW. Prevalence and spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma. *The New England Journal of Medicine* 326:1301-8, 1992.

UEDA Y, DOCKHOM-DWORNICZAK B, BLASIUS S, MELLIN W, WUISMAN P, BOCKER W, ROESSNER A. Analysis of mutant p53 protein in osteosarcomas and other malignant and benign lesion of bone. *J Cancer Res Clin Oncol* 119:172-8, 1993.

VAN DER BLIEK AM, BAAS F et al. The human *mdr 3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J* 6:3325-31, 1987.

VAN DER GEER P, HUNTER T, LINDBERG RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annual Review of Cell Biology* 10:251-337, 1994.

VASSILEV LT. Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research of tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* 3(4):419-21, 2004.

VERRELLE P, MEISSONNIER F, FONCK Y. Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 83:111-4, 1991.

VOGELSTEIN B, LANE D, LEVINE AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810):307-10, 2000.

YARDEN Y, KUANG WJ, YANG-FENG T, COUSSENS L, MUNEMITSU S, DULL TJ et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 6(11):3341-51, 1987.

YARDEN, Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 61(suppl 2):1-13, 2001.

YOSHITANI K, HONOKI K, MORISHITA T, KIDO A, MIYAUCHI Y, MII Y, TAKAKURA Y. Growth inhibition of rat osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma cells by tyrosine kinase inhibitor STI571. *In Vivo* 17(3):255-8, 2003.

WUNDER JS, BULL SB, ANELIUNAS V, LEE PD, DAVIS AM, BEAUCHAMP CP, CONRAD EU, GRIMER RJ, HEALEY JH, ROCK MJ, BELL RS, ANDRULIS IL. *MDR1* Gene Expression and Outcome in Osteosarcoma: A Prospective, Multicenter Study. *Journal Clinical Oncology* 18(14):2685-94, 2000.

WUNDER JS, GOKGOZ N, PARKES R, SHELLEY BB, ESKANDARIAN S, DAVIS AM, BEAUCHAMP CP, CONRAD EU, GRIMER RJ, HEALEY JH, MALKIN D, MANGHAM DC, ROCK MJ, BELL RS, ANDRULIS IL. *TP53* mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. *Journal of Clinical Oncology* 23(7):1483-90, 2005

ZHOU H, RANDALL RL, BROTHMAN AR, MAXWELL T, COFFIN CM, GOLDS RE. HER-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification. *J Pediatr Hematol Oncol* 25(1):27-32, 2003.

8. ANEXOS

8. ANEXOS:

ANEXO 1: PROTOCOLO BRASILEIRO COOPERATIVO DE TRATAMENTO DOS TUMORES ÓSSEOS (NÃO-METASTÁTICO) 2000.

Sem 0	Sem3	Sem 6	Sem 9	Aval
cispl	Ifos	cispl	Ifos	pré-op
adria	AD	adria	AD	
Sem 12	Sem 15	Sem18	Sem 21	Sem 24
CIRURGIA	cispl	Ifos	cispl	Ifos
	adria	AD	adria	AD
cisplatina 120 mg/m ² /ciclo			DT= 480 mg/m ²	
adriamicina 80 mg/m ² /ciclo			DT= 320 mg/m ²	
ifosfamida 13,5g/m ² /ciclo			DT= 54 g/m ²	

PARA OS OSTEOSARCOMAS METASTÁTICOS, REALIZA-SE UMA JANELA TERAPÊUTICA COM CICLOFOSFAMIDA EM ALTAS DOSES (4G/M² EM DOIS DIAS), POR DOIS CICLOS ANTES DO PROTOCOLO ACIMA.

ANEXO 2: PROTOCOLO DAS REAÇÕES DE IMUNO-HISTOQUÍMICA
P53, PCNA, MDM2, P-GLICOPROTEÍNA, C-KIT E C-ERB:

Desparafinização com xilol a quente (60°C) por 20 a 30 minutos e a temperatura ambiente por cinco minutos.

Hidratação dos cortes histológicos em concentrações decrescentes de álcool 100%, 92%, 70% respectivamente por 30 segundos.

Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.

Bloqueio de peroxidase endógena com água oxigenada 10 volumes em 15 banhos de cinco minutos.

Lavagem em água corrente, destilada.

Recuperação antigênica pelo calor, utilizando panela de pressão, imergindo as lâminas em solução tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0 por 5 minutos, resfriando-se em água corrente por 1 minuto, retira-se da panela de pressão.

Lavagem das lâminas em água corrente, destilada e três trocas em solução salina tamponada com fosfatos (PBS 10Mn pH 7,4) por três minutos.

Incubação com o anticorpo primário durante a noite a 4°C (over night) na geladeira, diluído em albumina bovina fração V Inlab Brasil código(BSA).

2º DIA:

Retira-se as lâminas da geladeira, deixá-las 30 minutos em temperatura ambiente.

Lavagem em solução de PBS (3 trocas) por três minutos.

P53, PCNA, MDM2, ErbB2, C-KIT, P-GLICOPROTEÍNA

Incubação do anticorpo secundário e complexo streptavidina do “kit” DAKO LSAB+, pronto para uso, para p53, PCNA, ErbB2, MDM2. Incubação do anticorpo secundário e complexo streptavidina “kit” DAKO Duet, diluído em BSA, para c-kit e p-glicoproteína.

Lavagem em solução de PBS (3 trocas) de três minutos.

Revelação da reação utilizando-se da seguinte solução substrato 60 mg de Diaminobenzidina Tetrahydrochloride Sigma Chemical CO USA código C5637, diluído em 100 ml de PBS, (pH 7,4). 375 µl de água oxigenada 30 volumes; durante 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

- Lavagem de 1 hora em água corrente e destilada.
- Contra coloração utilizando-se Hematoxilina de Harris por 4 minutos.
- Lavagem em água corrente.
- Desidratação dos cortes em concentrações crescentes de álcool a 70%, 92%, 100%.
- Imersão das lâminas em xilol.
- Montagem da lâmina com lamínula e Entellan (Entellan Merck-Germany código .o7961.0100).

**ANEXO 3: QUADRO DE PACIENTES COM ANÁLISE
IMUNOHISTOQUÍMICA**

numero	id	Meta	SLE	ST	C-erb	P-53	PCNA	PGP	c-Kit	MDM-2	ID AP
1	MSS	Não	43	47	neg	neg	neg	neg	neg		1000608
2	PNN	Não	42	46	neg	neg	NF	neg	pos	neg	1105434
3	ACBS	Não	42	46	neg	neg	neg	neg	pos		1001612
4	MSS	Não	0	14	pos	pos	pos	pos	pos		1003798
5	BRB	Não	40	43	neg	neg	neg	neg	neg		1003119
6	GGs	Não	48	51	neg	neg	neg	NR	neg		1101382
7	SAA	Não	9	24	neg	neg	pos	neg	neg	neg	1001809
8	TCF	Não	37	43	neg	neg	pos	neg	neg		1003615
9	MAF	Não	2	8	neg	neg	neg	neg	pos		1002929
10	ECSG	Não	39	42	neg	neg	pos	pos	pos	neg	1004182
11	AVA	Não	16	16	neg	neg	pos	neg	neg		1000233
12	JLM	Não	15	39	neg	neg	pos	neg	pos		1100661
13	FMS	Não	12	17	neg	neg	NF	neg	pos	neg	1117068
14	CJST	Não	26	30	neg	neg	neg	pos	pos		1106570
15	RCCS	Não	11	24							
16	MHR	Não	7	13	pos	neg	NF	pos	pos	neg	1119788
17	EDBV	Não	6	10							
18	JSC	Não	16	22	neg	neg	pos	pos	pos	neg	1112627
19	GGs	Não	17	21	neg	neg	pos	pos	pos	neg	1113070
20	CAS	Não	16	21	neg	neg	pos	neg	neg	pos	1113313
21	LFS	Não	6	12	neg	neg	pos	neg	pos	pos	1120204
22	NSS	Não	0	4	pos	pos	pos	pos	neg	neg	1116746
23	SSS	Não	10	13	neg	neg	pos	pos	pos	neg	1120409
24	NZBS	Não	22	18	neg	neg	pos	pos	pos	pos	1112295
25	RRM	Não	0	23	neg	neg	pos	pos	pos	pos	1112546
26	JARC	Sim	8	10	pos	pos	pos	pos	pos	pos	1100718
27	FVSF	Sim	0	14	pos	pos	pos	neg	pos	neg	1119311
28	EGS	Sim	0	13	neg	pos	pos	pos	pos	neg	1120310
29	MRO	Sim	0	14	neg	neg	pos	neg	neg	neg	1116967
30	JEBF	Sim	0	14	pos	pos	pos	pos	pos	pos	1121383
31	KST	Sim	0	10	neg	neg	NF	neg	pos	neg	1117602
32	AALJ	(multicêntrico)	0	10	pos	neg	pos	neg	neg	pos	1122924
33	JOS	Sim	0	2							
34	SPA	Sim	13	23	neg	neg	neg	neg	pos	neg	1112104
35	NSS	Sim	0	7	neg	pos	pos	pos	pos	pos	1108298
36	LARD	Sim	0	9							
		sim, meta óssea									
37	JCMS	multicêntrico	0	4	neg	neg	pos	neg	pos	neg	1105329
38	JBN	Sim	12	34	neg	neg	neg	neg	pos		1104187
39	JSS	sim, óssea	0	7	neg	pos	pos	neg	neg		1101358
40	WCS	Sim	16	31	neg	neg	pos	neg			1102990
41	RFO	Sim	0	6	neg	pos	pos	neg	neg		1005022
42	EFB	Sim	0	7	neg	neg	neg	pos	pos		1003739
43	EJS	Sim	0	4	neg	neg	neg		neg		1002147

LEGENDA: meta: metástases ao diagnóstico; SLD: sobrevida livre de doença; ST: sobrevida total; pos: positivo; neg: negativo; ID

AP: identificação do anátomo-patológico; NF: reação não funcionou; NR: não representativo

ANEXO 4:QUADRO DE PACIENTES COM ANÁLISE DE PARÂMETROS CLÍNICOS

num	ID	tipo histológico	local	meta	Huvos	SLD	ST	Sexo	Vol. Tumoral (cm3)
1	MSS	Osteoblástico	femur distal D	não	I (25%)	43	47	M	402,2
2	PNN	Osteoblástico	femur distal E	não	I(21%)	42	46	M	286,6
3	ACBS	Osteoblástico	femur distal D	não	I(6,2%)	42	46	M	762,6
4	MSS	Osteoblástico	maxila E	não	s/ resp a QT	0	14	F	
5	BRG	Osteoblástico	femur distal E	não	I(25%)	40	43	F	84,5
6	GGs	Osteoblástico	tibia prox E	não	II(57%)	48	51	M	222,3
7	SAA	Fibrohistiocítico	tibia prox E	não	II(60%)	9	24	F	141,57
8	TCF	Condroblástico	femur distal E	não	I(43%)	37	43	F	436,86
9	MAF	parostal grau III	femur E	não	I(35%)	2	8	F	514,8
10	ECSG		femur distal D	não	II(53%)	39	42	F	349,4
11	AVA	parostal grau III osteo e condroblástico	femur dist	não	I(15%)	16	16	M	728
12	JLM	periosteal grau III	femur prox D	não	pré-QT	15	39	F	116,4
13	FMS	Osteoblástico	femur dist E	não	II(63%)	12	17	F	177,45
14	CJST	Condroblástico	tibia prox D	não	I(0%)	26	30	M	300,3
15	RCCS	rico em céls gigantes com áreas epitelióides	femur distal E	não	II (64%)	11	24	M	43,6
16	MHR	Telangectásico	femur dist E	não	I (25%)	7	13	F	539
17	EDBV	tipo?	umero prox E	não	I	6	10	M	240,8
18	JSC	Condroblástico	femur dist D	não	I(28,5%)	16	22	M	1129,9
19	GGs	Osteoblástico	femur dist E	não	I(37,5%)	17	21	F	14,3
20	CAS	Condroblástico	tibia prox E	não	I(15%)	16	21	M	316,16
21	LFS	Condroblástico	femur dist E	não	I(3,6%)	6	12	M	1361,46
22	NSS	misto: condro e osteoblástico	femur dist E	não	óbito pré-op	0	4	F	211,4
23	SSS	tipo?	femur dist D	não	II(80%)	10	13	M	2074
24	NZBS	Osteoblástico	úmero prox E	não	I(13,1%)	18	22	F	146,4
25	RRM	c/ áreas de diferenciação condroblástica	femur dist D	não	ñ fez cirurgia	0	23	M	1872
26	JARC	Osteoblástico	tibia prox E	sim	I(35%)	8	10	M	330,9
27	FVSF	tipo?	femur dist E	sim	pré-QT	0	14	M	
28	EGS	Osteoblástico	umero prox E	sim	pré-QT	0	13	F	844,7
29	MRO	Osteoblástico	fibula prox E	sim	só Bx	0	14	F	
30	JEBF	Telangectásico	fibula prox D	sim	I(33%)	0	14	M	66,5
31	KST	tipo?	úmero prox D	sim	I(0%)	0	10	F	117
32	AALJ	Osteoblástico	femur dist D e mandíbula	sim	I(28%)	0	10	M	418,47
33	JOS	Osteoblástico	femur dist E	sim	óbito pré SO	0	2	F	924,7
34	SPA	Osteoblástico	femur dist E	sim	I(25,9%)	13	23	F	1573
35	NSS	Osteoblástico	umero prox	sim	não fez cirurgia	0	7	M	3942
36	LARD	Misto condroblástico e osteoblástico	tibia prox D	sim	pré-QT	0	9	M	1054,5
37	JCMS	tipo?	femur dist D	sim	não fez cirurgia	0	4	M	ñ tem
38	JBN	Condroblástico	tibia prox E	sim	I(22,7%)	12	34	M	807,3
39	JSS	Osteoblástico	rádio dist D	sim	não fez cirurgia	0	7	M	93,6
40	WCS	Osteoblástico	femur distal D	sim	II(60%)	16	31	M	479,2
41	RFO	Osteoblastico	femur distal D	sim	0% amp pré-QT	0	6	M	1506,6
42	EFB	áreas de padrão epitelióide	femur distal D	sim	0% amp pós-QT	0	7	M	2050
43	EJS	Osteoblástico	femur dist E	sim	não fez cirurgia	0	4	M	1776

Legenda: Meta-metástases ao diagnóstico; HUVOS- resposta histológica à quimioterapia pré-operatória; ST- sobrevida total; SLD- sobrevida livre de doença; pré-QT- pré-quimioterapia; M- masculino; F- feminino.