Samuel Aguiar Junior

**Análise do perfil de expressão gênica de sarcomas
de partes moles de extremidades de adultos
submetidos a quimioterapia neoadjuvante com
doxorubicina e ifosfamida**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia
Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

SÃO PAULO

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Aguiar Junior, Samuel

Análise do perfil de expressão gênica de sarcomas de partes moles de extremidades de adultos submetidos a quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ifosfamida / Samuel Aguiar Junior. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Ademar Lopes.

Descritores: 1.Sarcoma/cirurgia 2.Expressão gênica 3.Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos 4.Quimioterapia 5.Quimioterapia adjuvante 6.Fator transformador de crescimento beta 1 7.Radioterapia

USP/FM/SBD-282/07

Para **Tiago e Isabela**, sempre.

AGRADECIMENTOS

A **D'us**, acima de todas as coisas.

Aos meus **pais e minha irmã**, por terem me acompanhado durante toda a vida, incondicionalmente.

A minha esposa, **Amanda**, pelo apoio e compreensão presentes tanto nos momentos de felicidade como nos de turbulência.

Ao Prof. **Ademar Lopes**, pela orientação contínua desde a residência médica até conclusão desta tese.

À Dra. **Isabela Werneck**, pela realização e revisão de todos os exames anatomopatológicos e separação de todas as amostras.

Aos membros do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital A.C. Camargo, com atenção especial às Dras. **Waleska Kerllen Martins**, **Sara Marques** e **Mariana Maschietto**, cujo esforço e competência durante a fase de extração de RNA, amplificação e hibridização das amostras permitiu a realização desse estudo, e à Dra. **Dirce Maria Carraro**, pelas importantes orientações na fase de interpretação dos dados.

Aos Drs. **Alex Fiorini de Carvalho** e **Luiz Fernando Lima Reis**, por permitirem o uso da plataforma de “array”.

Ao grupo do laboratório de Bioinformática, em especial à Dra. **Helena Brentani** e ao **César Torres** pela realização das análises matemáticas e pela paciência em explicá-las.

Aos amigos do Departamento de Cirurgia Pélvica, **Benedito Mauro Rossi**,
Wilson Toshihiko Nakagawa, **Fábio de Oliveira Ferreira** e **Érika Monteiro**, não
só pela contribuição direta na condução da parte clínica do estudo, mas pelo
imprescindível suporte paralelo nas atividades assistenciais.

“Sete coisas distinguem o sábio do ignorante: o sábio não fala em presença de quem o ultrapasse em ciência ou em idade; nunca interrompe quem fala; não responde com precipitação; interroga com método e responde com precisão; discute as questões segundo a ordem em que foram colocadas; quando não compreende, confessa com franqueza; e curva-se diante da verdade. O ignorante faz precisamente o contrário.”

Tratado da Ética dos Pais. Capítulo 5. Mishná 9.

Sumário

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Evolução do tratamento dos sarcomas de partes moles em adultos: revisão da literatura.....	1
1.2- Radioquimioterapia neoadjuvante: experiência do Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brasil.....	10
1.3- Fatores prognósticos e preditivos de resposta em sarcomas de partes moles de adultos.....	17
2 OBJETIVOS.....	23
3 MÉTODOS.....	24
3.1- Tipo de estudo.....	24
3.2- Seleção de pacientes.....	24
3.2.1- Critérios de inclusão.....	24
3.2.1- Critérios de exclusão.....	25
3.3- Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.....	26
3.4- Diagnóstico, avaliação inicial e estadiamento.....	26
3.4.1- Coleta de material e diagnóstico anatomopatológico.....	26
3.4.2- Estadiamento.....	27
3.5- Plano terapêutico.....	27
3.5.1- Quimioterapia pré-operatória.....	28
3.5.2- Cirurgia.....	28

3.5.3- Radioterapia pós-operatória.....	29
3.6- Monitoração da toxicidade e avaliações periódicas durante a quimioterapia.....	30
3.7- Avaliação da resposta clínica.....	31
3.8- Avaliação da resposta anatomopatológica.....	32
3.9- Variáveis coletadas.....	33
3.10- Validação histopatológica das amostras.....	36
3.11- Extração do RNA total.....	36
3.12- Amplificação do RNA mensageiro e preparação das sondas.....	37
3.13- RNA referência.....	38
3.14- Marcação indireta das sondas.....	39
3.15- Hibridização e digitalização das imagens.....	39
3.16- Análise estatística.....	40
3.17- Financiamento.....	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1- Dados demográficos e clínicos.....	43
4.2- Dados do diagnóstico anatomopatológico e do estadiamento.....	45
4.3- Dados do tratamento pré-operatório.....	47
4.3.1- Adesão ao protocolo.....	47
4.3.2- Toxicidade.....	48
4.3.3- Resposta clínica à quimioterapia.....	49
4.4- Dados referentes à cirurgia.....	51
4.5- Dados anatomopatológicos das peças operatórias.....	51
4.6- Dados do seguimento.....	53
4.7- Análise da expressão gênica.....	56

4.7.1- Extração, amplificação, hibridização e normalização das amostras.....	56
4.7.2- Análise dos dados.....	58
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÕES.....	83
7 ANEXOS.....	85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

RESUMO

Aguiar Junior S. Análise do perfil de expressão gênica de sarcomas de partes moles de extremidades de adultos submetidos a quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ifosfamida [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 134p.

INTRODUÇÃO: A cirurgia associada à radioterapia proporciona altas taxas de preservação de membros e de controle local em sarcomas de partes moles de extremidade de adultos, mas ainda apresenta elevadas taxas de complicações locais e de metástases à distância. O valor da quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante ainda é controverso e objeto de investigações clínicas. A identificação de fatores moleculares preditivos de resposta à quimioterapia pode selecionar pacientes que se beneficiem ou não da sua aplicação. **OBJETIVOS:** identificar perfis de expressão gênica capazes de diferenciar tumores respondedores e não respondedores a quimioterapia neoadjuvante em sarcomas de partes moles. Analisar os resultados preliminares relativos à efetividade de um esquema de quimioterapia neoadjuvante em sarcomas de partes moles. **MÉTODOS:** amostras foram coletadas a partir de um ensaio clínico fase II não controlado que testa um esquema de quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ifosfamida em sarcomas de alto grau histológico, localizados em extremidades de pacientes adultos. O perfil de expressão gênica foi determinado pela análise de cDNA “microarrays”. **RESULTADOS:** 14 pacientes foram incluídos no estudo clínico e 6 amostras foram utilizadas para análise molecular. 222 seqüências diferentemente expressas entre respondedores e não

respondedores foram identificadas. Entre os genes com maior diferença de expressão, foram observados genes envolvidos com via de sinalização de TGF β , genes envolvidos com angiogênese, com degradação de matriz extracelular e com desenvolvimento. A taxa de resposta objetiva à quimioterapia neoadjuvante foi de 28,6%, a taxa de amputação foi de 7,1% e taxa de complicações relacionadas à ferida operatória foi de 23%. Complicações graus 3 e 4 ocorreram em 50% dos pacientes e nenhum deles faleceu ou teve a proposta cirúrgica suspensa em decorrência de complicações da quimioterapia. CONCLUSÕES: tumores respondedores a quimioterapia neoadjuvante com doxorrubicina e ifosfamida apresentaram um perfil de expressão gênica diferente dos não respondedores, particularmente em genes envolvidos na via de sinalização de TGF β . O esquema terapêutico testado mostrou-se efetivo e seguro para ser investigado em um estudo fase III.

Descritores: 1.Sarcoma/cirurgia 2.Expressão gênica 3.Análise de sequência com séries de oligonucleotídeos 4.Quimioterapia 5.Quimioterapia adjuvante 6.Fator transformador de crescimento beta 1 7.Radioterapia

SUMMARY

Aguiar Junior S. Gene expression profile of adult extremity soft tissue sarcomas submitted to neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin and ifosphamide [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2007. 134p.

INTRODUCTION: Surgery combined with adjuvant radiotherapy provides high rates of limb sparing and local control for adult extremity soft tissue sarcomas, but is still associated with high rates of local morbidity and distant recurrences. The role of adjuvant or neoadjuvant chemotherapy is still controversy and target of clinical investigations. The identification of molecular predictive factors of response to chemotherapy could select patients who have benefits or not with its use.

OBJECTIVES: to identify gene expression profiles that discriminate tumors with respect to response to neoadjuvant chemotherapy. Analyze the preliminary results of a protocol of neoadjuvant chemotherapy in soft tissue sarcomas. METHODS:

samples were collected from subjects of a single-arm prospective clinical trial that investigates the effectiveness of a neoadjuvant doxorubicin and ifosphamide-based chemotherapy regimen in high grade extremity soft tissue sarcomas in adults. Gene expression profiles were determined by the analysis of cDNA microarrays.

RESULTS: 14 patients were included in the clinical trial and six samples were used in the molecular study. 222 sequences differentially expressed between responders and non responders were identified. Among the genes with higher differences in expression, we have identified genes involved with TGF β signaling pathway, angiogenesis, extracellular matrix degradation and development. The objective

response rate to neoadjuvant chemotherapy was 28,6%, the amputation rate was 7,1%, and the wound complication rate was 23%. Grades 3 and 4 complications have occurred in 50 % of the cases, but no deaths or modifications on surgical intent related to chemotherapy complications have occurred. CONCLUSIONS: tumors considered responders to neoadjuvant chemotherapy showed a gene expression profile significantly different from non responders, especially with respect to the TGF β signaling pathway. The neoadjuvant regimen tested has showed to be effective and safe to be considering for a phase III clinical trial.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - EVOLUÇÃO DO TRATAMENTO DOS SARCOMAS DE PARTES MOLES EM ADULTOS: REVISÃO DA LITERATURA.

Os sarcomas de partes moles são neoplasias raras. Nos Estados Unidos, a estimativa para 2007 é de 9.220 casos novos e cerca de 3.560 óbitos.¹ No Brasil, as estimativas de incidência e mortalidade para sarcomas de partes moles de adultos não são relatadas nas fontes do Ministério da Saúde.

Esses tumores podem se originar em qualquer tecido de origem mesenquimal. Localizam-se nas extremidades em aproximadamente 50% dos casos, no tronco e retroperitônio em cerca de 30% a 40% e, mais raramente, em cabeça e pescoço (10%).²

A cirurgia tem um papel central no tratamento dos sarcomas de partes moles de extremidades do adulto. A ressecção ampla com margem de 2,0 cm de tecido normal ao redor do tumor é a estratégia primária de tratamento.^{3,4} A ressecção ampla tridimensional é o tratamento exclusivo para casos selecionados em que é possível a obtenção de margens amplas, livres e adequadas, em tumores de baixo grau histológico.^{5,6}

A proximidade das lesões com estruturas vâsculo-nervosas dos membros determinou altas taxas de amputações durante várias décadas para se obter margens adequadas. Apesar da radicalidade, grande parte dos pacientes morria em decorrência de recaída em órgãos à distância, particularmente pulmonar. A partir da década de 80, resultados publicados de instituições que realizaram cirurgias conservadoras

associadas à radioterapia adjuvante demonstraram boas taxas de controle local, entre 78% e 91%, e sem mudanças nas taxas de sobrevida global.^{7,8} Dois estudos prospectivos e randomizados validaram esses resultados.^{9,10} Atualmente, as amputações e desarticulações são realizadas em apenas 5% a 10% de todos os casos.⁴

A modalidade (radioterapia externa ou braquiterapia) e o momento (pré ou pós-operatória) da radioterapia ainda são motivos de discussão. A abordagem inicial com cirurgia oferece a vantagem de avaliação anatomopatológica mais adequada e está associada a menores índices de complicações da ferida operatória. No entanto, tem por desvantagem considerável a maior dificuldade para realização de ressecção completa, ainda que marginal, com risco de ruptura do tumor e contaminação do leito operatório. Algumas vantagens são apontadas a favor da radioterapia pré-operatória:

1) a melhor oxigenação de tecidos sem manipulação cirúrgica prévia, o que pode aumentar o efeito citotóxico da radioterapia; 2) o campo de irradiação é menor quando o planejamento é pré-operatório; 3) ao diminuir volume tumoral, a radioterapia pré-operatória parece tornar a cirurgia tecnicamente mais factível quando não é possível a obtenção de margens tridimensionais adequadas.^{3,11}

As desvantagens da radioterapia neoadjuvante se relacionam principalmente às altas taxas de complicações relacionadas à ferida operatória.^{12,13} Um estudo canadense prospectivo e randomizado comparou radioterapia pré e pós-operatória em sarcomas de membros, onde o objetivo primário foi comparar as taxas de complicações sobre ferida operatória entre os dois grupos. Noventa e quatro pacientes foram randomizados para receber radioterapia neoadjuvante e 96, para receber radioterapia pós-operatória. Complicações em ferida operatória foram observadas em 35% dos pacientes tratados antes da cirurgia e em 17% dos pacientes

que receberam radioterapia pós-operatória (diferença de 18%; com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre 5 – 30; $p=0,01$). Nesse estudo, embora a análise de sobrevida não tiver sido o objetivo principal e o tempo de seguimento mediano ter sido relativamente curto (3,3 anos), a sobrevida global foi discretamente melhor para o braço que recebeu radioterapia pré-operatória ($p= 0,048$).¹³

Apesar dos avanços obtidos com relação ao controle local da doença e à preservação de membros, a sobrevida global não experimentou melhoras significativas nas últimas décadas e as taxas de recaída pulmonar e óbito têm permanecido praticamente inalteradas. Esse cenário é muito bem representado em um estudo realizado pelo Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.¹⁴ Naquela instituição, 1706 pacientes portadores de sarcomas de partes moles de extremidades foram tratados entre janeiro de 1982 e dezembro de 2001 e seguidos prospectivamente. A sobrevida específica por câncer foi analisada por períodos de tratamento (1982 a 1986; 1986 a 1991; 1992 a 1996; 1996 a 2001) e se manteve sem diferenças significativas no decorrer dos anos, mesmo no subgrupo de pacientes de alto risco (alto grau, tumor maior que 10 cm e profundo). As taxas de sobrevida também se mantiveram inalteradas em função dos fatores prognósticos já estabelecidos (tamanho e profundidade do tumor, grau histológico, margens microscópicas, idade e *status* à apresentação (primário ou recidivado), analisados por período de tratamento, indicando que o que determina a sobrevida ainda são fatores prognósticos relacionados principalmente à neoplasia e não a avanços terapêuticos.

Diminuição das taxas de metástases a distância, particularmente pulmonar, e conseqüente aumento de sobrevida deveriam ser obtidos através de tratamento sistêmico adjuvante. Até o momento, três drogas, a doxorubicina, a dacarbazina e a

ifosfamida, demonstraram taxas de resposta maiores que 20% em doença metastática.⁴ Em doença localizada, o uso de quimioterapia adjuvante em sarcomas de partes moles tem sido analisado tanto em estudos prospectivos e controlados como em meta-análise e revisões sistemáticas e permanece bastante controverso.^{6, 15,16} Uma meta-análise que analisou 1.568 pacientes provenientes de 14 ensaios clínicos randomizados que utilizaram esquemas de quimioterapia adjuvante baseados em doxorubicina demonstrou benefício de 7% de sobrevida em 10 anos a favor dos braços tratados com quimioterapia, mas apenas no subgrupo de pacientes com sarcomas localizados em extremidades.¹⁷ Os resultados dessa meta-análise geraram interpretações diferentes, onde alguns autores passaram a recomendar fortemente o emprego de quimioterapia pós-operatória em pacientes portadores de tumores de alto risco (alto grau, profundos e maiores que 5 cm); enquanto outros, considerando falhas na seleção dos estudos, não recomendam quimioterapia adjuvante para sarcomas fora de protocolos de investigação.^{18,19}

Um estudo prospectivo e randomizado italiano posterior à meta-análise citada se propôs a comparar o emprego de quimioterapia adjuvante baseado em cinco ciclos da combinação de doxorubicina (60 mg/m² nos dias 1 e 2, totalizando 120 mg/m² por ciclo) e ifosfamida (1,8 g/m², nos dias 1 a 5, totalizando 9 g/m² por ciclo) com um grupo controle, selecionando apenas pacientes com tumores de alto grau histológico e de extremidade. Cento e quatro pacientes foram recrutados e, após seguimento de 59 meses, a sobrevida global mediana foi de 75 meses para o grupo tratado contra 46 meses para o grupo controle (p=0,03). O benefício absoluto com emprego de quimioterapia adjuvante com o esquema utilizado foi de 13% em dois anos e aumentou para 19% em quatro anos (p=0,04).²⁰

Apesar de bem desenhado, o estudo italiano recebeu críticas importantes referentes a algumas diferenças de características relacionadas ao tumor entre os dois grupos e principalmente ao fato da taxa de recaída pulmonar em quatro anos ter sido praticamente igual entre os dois braços, apesar da diferença significativa de sobrevida global.²¹

Um outro estudo analisou conjuntamente uma coorte de 674 pacientes portadores de sarcomas de partes moles de extremidades de alto risco e não metastáticos, tratados em dois grandes centros de referência norte-americanos, com objetivo de avaliar o efeito da quimioterapia adjuvante, a partir de informações provenientes de bancos de dados prospectivos e retrospectivos dessas duas instituições.²² A metade dos pacientes foi tratada apenas com tratamento local, enquanto a outra metade recebeu algum esquema de quimioterapia adjuvante. Os autores observaram diferença significativa de sobrevida específica para câncer após um ano de tratamento a favor da quimioterapia (razão acidental de 0,37, com IC95% entre 0,20 e 0,69), porém, após cinco anos de tratamento não se observou mais benefício com tratamento adjuvante.

Um outro estudo randomizado (EORTC 62931) recrutou 351 pacientes para receber quimioterapia pós-operatória com doxorubicina e ifosfamida ou observação, mas ainda não publicou seus resultados. Diante da casuística expressiva, talvez os resultados desse estudo sejam determinantes para confirmar ou não o benefício da quimioterapia adjuvante em sarcomas de partes moles.²³

Mesmo que ainda controvertido, se de fato houver benefício com emprego de quimioterapia sistêmica adjuvante, esta deve ser iniciada precocemente. As elevadas taxas de complicações relacionadas ao sítio cirúrgico atribuídas ao efeito

radioterápico pré-operatório se apresentam freqüentemente como fator limitante para o início do tratamento sistêmico pós-operatório.

Vários protocolos têm empregado a quimioterapia concomitantemente à radioterapia de forma neoadjuvante. Muitos deles utilizam a doxorrubicina concomitante à radioterapia com finalidade de aumentar a sensibilidade. Revisões não sistemáticas apontam para taxas de controle locorregional atribuídas à radioterapia e quimioterapia concomitantes (radioquimioterapia) pré-operatórias superiores aos resultados históricos de radioterapia adjuvante isolada, mas também com elevadas taxas de complicações pós-operatórias, oscilando entre 26% e 30%.^{12, 24, 25}

Um ensaio clínico não randomizado conduzido por uma única instituição norte-americana adotou um esquema com combinação de adriamicina (20 mg/m²), ifosfamida (2,0 g/m²) e dacarbazina (250 mg/m²) (MAID) em três ciclos pré-operatórios concomitantes a radioterapia, seguidos por cirurgia, em 48 pacientes consecutivos portadores de sarcomas de alto grau de extremidades maiores que 8 cm.²⁶ O esquema previa mais três ciclos de quimioterapia pós-operatória. Utilizando os critérios do RECIST²⁷ para avaliação de resposta, os autores encontraram resposta parcial em 10,6% dos pacientes e nenhuma resposta completa foi observada aos exames de imagem. 12,8% dos pacientes apresentaram progressão à avaliação radiológica. À avaliação anatomopatológica, necrose maior de 99% foi observada em 14 pacientes. Apenas dois pacientes apresentaram peças com necrose menor que 50% e dos seis pacientes que haviam apresentado progressão radiológica, todos apresentavam necrose maior que 50% nas peças cirúrgicas.²⁶

Os resultados desse estudo estimularam a realização de um ensaio clínico multi-institucional (Radiation Therapy Oncology Group – RTOG 9514) fase II com objetivo de validar a efetividade do mesmo esquema. Os resultados desse estudo foram publicados recentemente.²⁸ Foram tratados 64 pacientes portadores de sarcomas de alto grau ou maiores que 8 cm, localizados em extremidade ou tronco. Os investigadores observaram toxicidade fatal em 5% dos pacientes e toxicidade grau 4 em 84%, a maioria de natureza hematológica. Sessenta e um pacientes foram operados, dentre os quais 5 sofreram amputação (7,8%). As taxas estimadas em três anos para sobrevida livre de doença, sobrevida livre de metástases e sobrevida global foram, respectivamente, 56,6%, 64,5% e 75,1%. Apesar do otimismo dos investigadores, esses resultados foram severamente criticados, particularmente em relação às elevadas taxas de complicações.²⁹

Consideramos que o plano terapêutico ideal para os sarcomas de partes moles de extremidades deva respeitar dois enfoques principais: 1) altas taxas de controle locorregional com cirurgia preservadora de membros, com baixos índices de complicações da ferida operatória; 2) tratamento de micrometástases pulmonares subclínicas ao diagnóstico.

Alguns trabalhos baseados nos princípios acima citados trouxeram informações adicionais que, face aos problemas abordados, questionam a real necessidade da radioterapia neoadjuvante. O papel da radioterapia está voltado para o controle local, mas não tem influência sobre o controle da doença micrometastática. Já a quimioterapia tem efeito tanto local como sistêmico. Se os índices de resposta com utilização exclusiva de quimioterapia neoadjuvante se mostrarem significativos, poderíamos suprimir a radioterapia da fase inicial do tratamento e minimizar as

complicações, sem perder a possibilidade de uso da radioterapia como modalidade adjuvante. Esta abordagem teria a vantagem de permitir o uso de esquemas combinados de quimioterapia em doses mais altas, pouco toleradas quando concomitantes à radioterapia, com vistas a diminuir o risco de recaída pulmonar já nas fases iniciais do plano terapêutico.

Em 1985 o Washington Cancer Institute iniciou uma série de estudos com quimioterapia de indução em pacientes adultos portadores de sarcomas de partes moles, administradas por via endovenosa ou intra-arterial. Inicialmente, o objetivo era de evitar amputações em pacientes portadores de extensas lesões em locais de difícil abordagem cirúrgica. Posteriormente, os trabalhos procuraram avaliar as taxas de resposta clínica, o grau de necrose conseguido com a quimioterapia e o prognóstico dos pacientes portadores de sarcomas de partes moles de extremidades de alto risco.³⁰ A análise detalhada da publicação de Henshaw et al nos mostra altos índices de preservação de membros, com elevadas as taxas de controle local, sobrevida global e sobrevida livre de doença em pacientes portadores de sarcomas de partes moles de alto grau de extremidades, não passíveis de ressecção com margem adequada na avaliação inicial, tratados com quimioterapia de indução (endovenosa e intra-arterial), seguida de cirurgia e quimioterapia adjuvante, porém sem utilização de radioterapia em qualquer das fases de tratamento. Apesar do pequeno número de pacientes da amostra analisada (n=33), os resultados são animadores quanto à eficácia do uso de quimioterapia neoadjuvante. No entanto, devemos lembrar que 12 pacientes dos 46 não foram analisados porque precisaram receber radioterapia pós-operatória, cuja indicação se fez com base no alto risco de recidiva local em função de margens cirúrgicas exíguas, cirurgia prévia fora de padrões oncológicos

(contaminação do leito operatório) ou resposta insatisfatória à quimioterapia de indução.

Mais recentemente, um estudo multicêntrico fase II randomizado testou um esquema de quimioterapia sistêmica neoadjuvante empregando três ciclos de uma combinação de adriamicina (50 mg/m^2 no dia 1), seguida por 24 horas de infusão contínua de ifosfamida (5 g/m^2), comparando com cirurgia isolada. O desenho do estudo previa a inclusão de pacientes portadores de sarcomas não metastáticos de membros, cabeça e pescoço, tronco ou pélvis, considerados de alto risco, definidos como tumores maiores que 8 cm (qualquer grau histológico); ou tumores grau II ou III (qualquer tamanho); ou tumores graus II ou III recidivados ou operados de forma inadequada. Foram considerados elegíveis 134 pacientes, sendo 67 em cada braço. Pacientes com margens consideradas inadequadas receberam radioterapia pós-operatória. 87% dos pacientes randomizados para receber quimioterapia completaram os 3 ciclos previstos no protocolo. Toxicidade hematológica severa ocorreu em 8% dos casos, resultando em um óbito. Resposta clínico-radiológica objetiva foi observada em 29% dos casos, sendo completa em 8%. Não foi descrita avaliação da resposta anatomopatológica no estudo. Não houve diferença nas taxas de complicações pós-operatórias entre os dois braços e o tratamento neoadjuvante não comprometeu a realização das outras modalidades de tratamento subsequentes (cirurgia e radioterapia). Em função da dificuldade e demora no recrutamento de pacientes, os investigadores não estenderam o estudo para fase III.³¹ Esses resultados validam algumas das conclusões provenientes dos dados retrospectivos de Henshaw et al, no sentido de demonstrar que é possível obter-se, com quimioterapia

exclusiva, taxas de resposta local semelhantes às obtidas com radioterapia pré-operatória, sem comprometimento do planejamento cirúrgico.

1.2 - RADIOQUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE: EXPERIÊNCIA DO HOSPITAL A.C. CAMARGO, SÃO PAULO, BRASIL.

A partir de 1995, os Departamentos de Cirurgia Pélvica, Radioterapia e Oncologia Clínica do Hospital A.C. Camargo organizaram diretrizes para padronizar o tratamento dos sarcomas de partes moles em extremidades de adultos naquela instituição. Essas diretrizes podem ser resumidas no seguinte fluxograma.

Figura 1 – Fluxograma para tratamento de sarcomas de partes moles de extremidades de adultos, sem radioterapia ou quimioterapia prévia, do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

Legenda: TC – tomografia computadorizada; RNM – ressonância nuclear magnética; RxT – radioterapia; QT – quimioterapia

Segundo a rotina estabelecida, o que determina a indicação de tratamento pré-operatório é a avaliação da ressecabilidade determinada por um dos cirurgiões do Departamento de Cirurgia Pélvica, a partir de dados do exame físico e do exame de imagem (tomografia ou ressonância).

Para os pacientes portadores de doença metastática à apresentação, cujas metástases não são passíveis de ressecção, prioriza-se o tratamento sistêmico, deixando-se a indicação de tratamento local (cirurgia e/ou radioterapia) na dependência da sintomatologia e do tempo de progressão local e à distância.

Os pacientes portadores de doença metastática à apresentação, com metástases ressecáveis, são tratados com intenção curativa e seguem o protocolo de radioquimioterapia pré-operatória, seguida de ressecção do tumor primário e ressecção das metástases. Nesses casos, considera-se quimioterapia adjuvante após a ressecção das metástases.

Pacientes admitidos com antecedente de radioterapia e/ou quimioterapia em outra instituição não entram no fluxograma descrito e têm sua estratégia de tratamento individualizada, de acordo com as modalidades terapêuticas previamente utilizadas.

Observa-se que indicamos tratamento neoadjuvante mesmo para tumores de baixo grau histológico, se as dimensões e a localização da lesão não permitirem ressecção com margens tridimensionais adequadas.

A radioterapia pré-operatória é realizada através de teleterapia com dose total de 30 Gy, com fracionamento de 250 cGy ao dia, 5 vezes por semana (12 sessões).

Para quimioterapia concomitante, emprega-se adriamicina na dose de 20 mg/m² nos dias 1, 8 e 15, totalizando 60 mg/m².

A cirurgia é realizada dentro de 4 a 6 semanas após o término da radioterapia.

Entre janeiro de 1995 e dezembro de 2004, 240 pacientes foram admitidos no Hospital A.C. Camargo com diagnóstico de sarcoma de partes moles de membros, incluindo localização em cintura pélvica e escapular. A partir dessa amostra total, identificamos 49 pacientes com tumores localmente avançados e sem antecedente de radioterapia ou quimioterapia prévia, que foram tratados de acordo com o protocolo institucional de radioquimioterapia neoadjuvante. As tabelas 1, 2 e 3 expõem as características clínico-patológicas dessa amostra.

Tabela 1 - Características clínicas de uma amostra de 49 pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo através de radioquimioterapia pré-operatória

Variável		n (%)
Idade mediana (anos)		48 (16 – 72)
Gênero	masculino	20 (40,8%)
	feminino	29 (59,2%)
Topografia	membro inferior	36 (73,5%)
	membro superior	7 (14,3%)
	cintura pélvica	4 (8,2%)
	cintura escapular	2 (4,1%)
Tamanho mediano (cm)		15 (5 – 40)
Manipulação prévia	biópsia incisional	22 (44,9%)
	intacto	12 (24,5%)
	ressecção recente*	8 (16,3%)
	recidivado**	6 (12,2%)

* Consideramos ressecção recente o antecedente de cirurgia para ressecção em outra instituição até três meses antes da admissão. ** Consideramos tumor

recidivado quando havia história de um ou mais procedimentos de ressecção com mais de três meses de antecedência em relação à data da admissão.

Tabela 2 - Características anatomopatológicas pré-tratamento de uma amostra de 49 pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo através de radioquimioterapia pré-operatória

Variável		n (%)
Tipo histológico	sarcoma sinovial	10 (20,4%)
	lipossarcoma	9 (18,4%)
	histogênese indeterminada	5 (10,2%)
	leiomiossarcoma	5 (10,2%)
	FHM	5 (10,2%)
	sarcoma pleomórfico	4 (8,2%)
	sarcoma fusocelular	3 (6,1%)
	TMBNP	3 (6,1%)
	sarcoma epitelióide	2 (4,1%)
	angiossarcoma	1 (2,0%)
	rabdomiossarcoma	1 (2,0%)
Grau histológico	I	11 (22,4%)
	II	9 (18,4%)
	III	28 (57,1%)
	indeterminado	1 (2,0%)

FHM: fibrohistiocitoma maligno; TMBNP: tumor maligno da bainha do nervo periférico.

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes segundo estadiamento AJCC.²⁹

Estádio	n (%)
I	10 (20,4%)
II	5 (10,2%)
III	29 (59,2%)
IVb	5 (10,2%)

Durante o tratamento pré-operatório, houve 3 casos de toxicidade grau 3, todas de natureza hematológica, e não ocorreu nenhum óbito relacionado ao tratamento.

Em função do caráter retrospectivo da análise dessa casuística, a determinação de resposta objetiva ao tratamento pré-operatório tornou-se bastante prejudicada. Encontramos, nos prontuários médicos, descrição dos diâmetros dos tumores antes e depois da radioterapia, medidos por tomografia ou ressonância, em apenas 10 casos. Desses, houve resposta parcial em um caso, doença estável em sete e progressão local em dois, segundo os critérios RECIST.²³ Apesar de não ser considerado um parâmetro objetivo, houve resposta significativa ao tratamento pré-operatório, de acordo com a descrição do exame físico do cirurgião, em 16 (32,7%) pacientes. Essa resposta clínica, determinada ao exame físico, é descrita como diminuição do tamanho do tumor e/ou melhora da mobilidade da lesão, fatores esses subjetivamente associados à melhor ressecabilidade e à maior chance de preservação do membro.

Dos 49 pacientes que completaram o esquema de radioterapia concomitante a quimioterapia, 43 foram operados. Entre os seis pacientes que não foram operados, três recusaram a cirurgia em função da possibilidade de amputação, dois por progressão sistêmica da doença e um por progressão local. A taxa de amputação

entre os 49 pacientes, considerando-se a intenção de tratamento, foi de 14,3% (sete casos).

Entre os 43 pacientes submetidos a cirurgia, 18 (41,8%) evoluíram com complicações severas relacionadas à ferida operatória. Definiu-se complicação severa em ferida operatória quando houve necessidade de debridamento de tecidos desvitalizados. A maioria dessas complicações se associou a longos períodos de tratamento até a resolução.

À avaliação anatomopatológica das peças operatórias, observou-se necrose maior que 95% em 5 (11,6%) espécimes, sendo duas respostas patológicas completas (4,7%).

Dezenove pacientes portadores de tumores de alto grau não-metastáticos à admissão, com menos de 50 anos de idade, seriam elegíveis para receber quimioterapia adjuvante, de acordo com o protocolo institucional. Desses, apenas cinco pacientes receberam quimioterapia pós-operatória. Os outros 14 não foram tratados com quimioterapia em função das complicações relacionadas à ferida operatória.

As taxas de sobrevida livre de recidiva local, sobrevida livre de recaída sistêmica e sobrevida global em cinco anos foram, respectivamente, 81,6%, 52,9% e 58,3%. O tempo de seguimento mediano foi de 32,1 meses, variando de 7,6 a 132,3 meses, e a taxa de perda de seguimento foi de 4,5 %.

Figura 2 - Curvas de sobrevida para 49 pacientes portadores de sarcomas de partes moles de extremidades de adultos, tratados por radioquimioterapia seguida de cirurgia, no Hospital A.C. Camargo: A – sobrevida livre de recidiva local; B – sobrevida livre de metástases; C – sobrevida global; D – sobrevida livre de metástases em função do grau histológico

Os resultados descritos são comparáveis aos publicados por outras instituições, traduzindo-se em boas taxas de controle local, elevadas taxas de complicações pós-operatórias relacionadas à ferida e altas taxas de recaída sistêmica e óbito por câncer, o que nos levou a propor um estudo clínico prospectivo ainda de fase II, com objetivo de testar a efetividade de um esquema de tratamento com quimioterapia pré-operatória exclusiva, seguida de cirurgia, deixando-se a radioterapia para a fase pós-operatória.

1.3 - FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DE RESPOSTA EM SARCOMAS DE PARTES MOLES DE ADULTOS

Os principais fatores significativamente associados com recaída e óbito em sarcomas de partes moles são o grau histológico; o tamanho do tumor; a profundidade do tumor em relação à fáscia muscular e presença ou não de metástases linfonodais e hematogênicas.⁴ Esses fatores foram identificados como variáveis independentes nas análises multivariadas de grandes estudos de coorte e são utilizados na última versão do sistema de estadiamento TNM.³²⁻³⁶

Atualmente, o grau histológico é considerado o fator prognóstico mais importante em sarcomas de partes moles e também é utilizado como fator preditivo de resposta às terapêuticas citotóxicas, prevendo-se melhores taxas de resposta em tumores de alto grau.⁴ Porém, não é incomum observarmos, na prática clínica, boas taxas de necrose induzida por radio e quimioterapia em alguns sarcomas de partes moles de baixo grau, assim como resultados frustrantes em outros tumores de alto grau, concluindo-se que o valor preditivo do grau histológico para radio ou quimiossensibilidade ainda não pode ser considerado ótimo.

Nas últimas décadas, temos observado grande entusiasmo com os avanços na oncologia molecular. Os marcadores moleculares têm sido alvo de otimismo com relação a sua capacidade de prever os desfechos de recaída e óbito (valor prognóstico) ou a resposta à terapêutica (valor preditivo) em diversas neoplasias.

O valor prognóstico de marcadores moleculares em sarcomas de partes moles ainda é muito pouco estudado.

A identificação de algumas translocações cromossômicas que determinam a formação de genes de fusão associados a determinados tipos histológicos de sarcomas, como em tumores da família Ewing (gene de fusão EWS-FL11)^{37,38}, em rabdomiossarcomas alveolares (genes de fusão PAX3-FKHR e PAX7-FKHR)^{39,40} e em sarcomas sinoviais (SYT-SSX1)^{41, 42}, vem estimulando a investigação do valor prognóstico dessas características moleculares. Porém, as tentativas de correlação com recidiva e óbito têm sido inconsistentes, provavelmente em razão do caráter retrospectivo dos estudos e das dificuldades para inferências estatísticas determinadas pela raridade da doença e pela grande heterogeneidade dos tipos histológicos e das modalidades de tratamento.^{43,44}

Como fatores preditivos de resposta, os marcadores moleculares são ainda menos estudados em sarcomas de partes moles de adultos. Destaca-se um estudo que analisou o valor prognóstico e preditivo de alterações em p53 e p16/p14ARF em 60 pacientes portadores de tumores da família Ewing. O valor preditivo de resposta à quimioterapia foi avaliado em um subgrupo de 32 pacientes. A presença de deleções em p16/p14ARF e/ou mutações em p53, determinadas por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e imunoistoquímica, respectivamente, correlacionaram-se significativamente com resposta pobre à quimioterapia neoadjuvante (graus 1 e 2 de resposta patológica, pela classificação de Huvos).⁴⁵

O desenvolvimento e atual disponibilidade das análises de “microarrays” trazem novas perspectivas ao estudo da biologia das neoplasias. “Microarrays” são “chips” preparados a partir de uma impressão robótica de milhares de seqüências de DNA sobre um suporte sólido, usados para determinar quantitativamente a expressão concomitante de milhares de genes ou seqüências.^{46,47} Enquanto as técnicas mais

convencionais de determinação de expressão de genes ou proteínas (imunoistoquímica, FISH, reação em cadeia da polimerase (PCR), seqüenciamento, etc) permitem a análise de um único marcador por experimento, a análise de “microarray” permite a determinação quantitativa e simultânea da expressão de milhares de genes, caracterizando perfis de expressão gênica. Isto, teoricamente, permite o estudo de vias inteiras de sinalização e das interações entre elas e não mais de um único gene ou proteína individualmente.

Com relação a esse tipo de metodologia empregada em sarcomas de partes moles, os trabalhos até agora publicados também são predominantemente descritivos (tabela 4), onde alguns genes têm sido identificados como expressos diferentemente em tumores em relação ao tecido conjuntivo normal ou em um determinado subtipo histológico em relação a outro. ⁴⁴⁻⁵⁰

Tabela 4 - Estudos descritivos que utilizaram de análises de “microarrays” em sarcomas

Autor	n	Achados
Nagayama S, et al ⁴⁸	47	Identificação de duas subclasses de sarcoma sinovial quanto à diferenciação epitelial
Allander SV, et al ⁴⁹	37	Genes diferentemente expressos em sarcomas sinoviais
Fritz B, et al ⁵⁰	16	Lipossarcomas pleomórficos e desdiferenciados têm perfis de expressão gênica distintos
Nielsen TO, et al ⁵¹	41	Sarcomas sinoviais, GIST e tumores neurogênicos têm perfis de expressão gênica distintos
Skibutz KM, et al ⁵²	-	Identificação de genes diferentemente expressos em leiomiossarcomas
Skibutz KM, et al ⁵³	35	Identificação de diferenças de expressão gênica entre lipossarcomas, lipomas e tecido adiposo normal
Baird K, et al ⁵⁴	181	Descreve perfis de expressão gênica distintos em vários subtipos histológicos
Nakayama R, et al ⁵⁵	105	Reclassifica fibrohistiocitomas malignos

O emprego de análise de “microarrays” para identificar fatores prognósticos e fatores preditivos de resposta à quimioterapia tem sido relatado em poucas publicações, predominantemente em tumores ósseos.

Um trabalho israelense, ao analisar 21 amostras de sarcomas de Ewing, identificou dois perfis distintos de expressão gênica em função do prognóstico favorável ou não. Entre os pacientes com pior prognóstico, os tumores apresentavam expressão aumentada de genes envolvidos no ciclo celular e nos mecanismos de invasão e metástases e expressão diferentemente diminuída de genes pró-apoptóticos.⁵⁶

Um estudo britânico, em uma análise de 27 amostras de leiomiossarcomas, também identificou uma assinatura de expressão gênica que diferenciou significativamente tumores com potencial metastático. O pior prognóstico também esteve associado à expressão aumentada de genes envolvidos com regulação do ciclo celular e com transmissão de sinal.⁵⁷

Um grupo sueco analisou a expressão gênica também por “microarray” de 26 amostras de sarcomas sinoviais. Apesar de não ter sido o objetivo principal do trabalho, os autores também identificaram uma assinatura genética associada ao desenvolvimento de metástases. Os próprios autores chamam atenção para a alta probabilidade de resultado falso-positivo, em função do tamanho da amostra e do desenho do estudo.⁵⁸

Um estudo multicêntrico escandinavo reuniu uma expressiva casuística de 177 amostras de sarcomas de partes moles, de vários subtipos histológicos. Além de diferenciar geneticamente subtipos histológicos, a contribuição mais significativa desse estudo foi a identificação de uma assinatura genética para tumores com maior risco de metástases. Os principais genes incluídos nessa assinatura genética eram genes induzidos por hipóxia.⁵⁹

Com relação à identificação de um perfil de expressão associado à resposta à quimioterapia, encontramos, até o momento, resultados publicados apenas para osteossarcomas. Três estudos se propuseram a esse objetivo e os três trabalhos identificaram assinaturas genéticas associadas à resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante. Porém, não houve sobreposição de grupos de genes entre os três estudos e cada um dos trabalhos identificou grupos de genes associados a vias metabólicas ou proliferativas totalmente diferentes.^{60 - 62}

Exceção feita aos tumores estromais gastrointestinais (GIST's), o perfil de expressão gênica de sarcomas de partes moles foi testado como fator preditivo de sensibilidade a drogas apenas em ensaios experimentais com linhagens celulares.^{63,64}

A ausência de publicações disponíveis até o momento que se proponham a correlacionar o perfil de expressão gênica em sarcomas de partes moles de adultos com quimiossensibilidade, associada à oportunidade de coletar material fresco em um ensaio clínico prospectivo nos estimulou a iniciar um estudo com objetivo de avaliar o perfil de expressão gênica de sarcomas de partes moles como fator preditivo de resposta à quimioterapia.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO PRIMÁRIO:

- Identificar perfis de expressão gênica em sarcomas de partes moles de extremidades de adultos que diferenciem tumores que respondem à quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ifosfamida daqueles que não respondem ao tratamento.

2.2 - OBJETIVOS SECUNDÁRIOS:

- Avaliar os resultados preliminares de um ensaio clínico fase II que testa um esquema de quimioterapia neoadjuvante combinada com doxorubicina e ifosfamida sem radioterapia concomitante, utilizando-se como desfechos a taxa de resposta objetiva sobre o tumor primário; a taxa de preservação de membros e a taxa de contra-indicação cirúrgica causada por complicações do tratamento ou por progressão de doença durante o tratamento pré-operatório.
- Determinar as taxas de toxicidade do esquema proposto

3 - MÉTODOS

3.1 - TIPO DE ESTUDO

Estudo observacional transversal.

3.2 - SELEÇÃO DE PACIENTES

Os pacientes sujeitos à pesquisa são provenientes de um estudo clínico prospectivo não controlado de fase II em andamento no Hospital A.C. Camargo desde janeiro de 2005, que investiga a efetividade de um esquema de tratamento neoadjuvante com doxorrubicina e ifosfamida em sarcomas de partes moles de adultos. Os critérios de inclusão e exclusão para o ensaio clínico são descritos a seguir.

3.2.1 - CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados elegíveis os pacientes que obedecerem a todos os seguintes critérios:

a) Pacientes com idade acima de 16 anos, portadores de sarcomas de partes moles de alto grau histológico de extremidades, incluindo cinturas pélvica e escapular, confirmado por exame anatomopatológico.

b) Tumores primários ou recidivados, não passíveis de ressecção com margem tridimensional de 2,0 cm com preservação do membro, julgamento este determinado pela avaliação clínica e radiológica do cirurgião. Considera-se tumor recidivado aquele com antecedente de uma ou mais cirurgias prévias com mais de três meses antes da admissão.

c) Índice de Karnofsky maior que 70%.

d) Contagem de leucócitos maior que $3.500 / \text{mm}^3$, neutrófilos maior que $1.500 / \text{mm}^3$ e de plaquetas maior que $100.000 / \text{mm}^3$; creatinina sérica abaixo de 1,5 mg/dL; dosagem sérica de bilirrubinas dentro do limite da normalidade e de transaminases até duas vezes o valor normal; ausência de sinais de insuficiência cardíaca, determinada pela fração de ejeção.

e) Viabilidade de seguimento (endereço fixo).

3.2.2 - CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Foram excluídos os pacientes que apresentarem um dos seguintes critérios:

a) Tipo histológico rabdomiossarcoma embrionário.

b) Tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET's).

c) Condrossarcomas ou osteossarcomas extraósseos.

d) Radioterapia ou quimioterapia como tratamento prévio.

f) Infecção por HIV.

g) Recusa em assinar Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.3 - TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

(anexos A e B)

O estudo teve início após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. Dois TCLE's foram preparados, um para consentimento em participar do estudo clínico e outro para consentimento em fornecer material biológico (tumor) para análise de expressão gênica.

3.4 - DIAGNÓSTICO, AVALIAÇÃO INICIAL E ESTADIAMENTO

3.4.1 - COLETA DE MATERIAL E DIAGNÓSTICO

ANATOMOPATOLÓGICO

Todos os pacientes foram submetidos a biópsia (incisional ou por agulha grossa guiada por tomografia) para confirmação histopatológica de sarcoma de partes moles, determinação do grau de malignidade histológica e coleta de material para análise molecular. Quando não foi possível a determinação do grau, a biópsia foi repetida. Nos casos de biópsia guiada por TC, dever-se-iam retirar mínimo 6 fragmentos de tumor e realizar exame de congelação para confirmar se o material era adequado para estudo definitivo em parafina. Nas biópsias por agulha, o sítio de punção deveria ser anotado.

O material para diagnóstico anatomopatológico foi coletado em formalina tamponada e incluído em parafina pelo processo tradicional. Tomou-se o cuidado

para que a fixação em parafina não ultrapassasse o período de 24 horas para padronização das reações imunoistoquímicas.

Parte do tecido tumoral coletado era imediatamente identificado e congelado em nitrogênio líquido ou imerso em solução RNA later (Ambion, Austin, TX, EUA) e armazenado em no máximo 24 horas em congelador a temperatura de -80°C .

O diagnóstico seguiu todas as possibilidades pela coloração por hematoxilina e eosina (HE) e imunoistoquímica. O diagnóstico e gradação seguiram a orientação da Organização Mundial de Saúde publicada na série “blue books” (Pathology & Genetics – WHO classification of tumors) ⁶⁵. A gradação foi realizada em 3 graus (anexo C).

3.4.2 - ESTADIAMENTO

Todos os pacientes realizaram tomografia computadorizada (TC) e/ou ressonância nuclear magnética (RNM) do local primário do tumor e TC de tórax. Para os portadores de lipossarcomas de extremidades, foi realizada TC ou ultrassonografia de abdome total e pelve para afastar possibilidade de lesão sincrônica retroperitoneal. O sistema de estadiamento utilizado foi o TNMG da American Joint Committee on Cancer (AJCC).³² Mesmo os tumores recidivados foram reclassificados de acordo com o TNM.

3.5 - PLANO TERAPÊUTICO

3.5.1 - QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA

Um ciclo a cada 21 dias, completando um total de **quatro (4) ciclos**:

- Doxorrubicina: 30 mg / m² por via endovenosa, em “bolus”, D1 e D2.
- Ifosfamida: 2,0 g/m²/dia por via endovenosa em 1 hora, D1 a D5.
- Mesna: 100% da dose de ifosfamida, 15 minutos antes e 4 horas e 8 horas

após o início da infusão de ifosfamida.

3.5.2 - CIRURGIA

Após a fase de quimioterapia de indução e avaliação da resposta clínica, os pacientes foram submetidos a cirurgia, num período de 3 a 4 semanas após o término do último ciclo de quimioterapia, desde que as condições hematológicas permitissem. Os pacientes que não pudessem ser operados num período máximo de 6 semanas após o término do último ciclo deveriam ser avaliados separadamente. Todos os pacientes deveriam ser candidatos a ressecção oncológica com preservação de membros. Aqueles cujas lesões não apresentassem resposta a ponto de permitir a preservação do membro seriam candidatos a novo esquema neoadjuvante, agora com radioterapia. A indicação de amputação ou desarticulação só seria considerada após ausência de resposta clínica suficiente para permitir cirurgia conservadora, mesmo após mudança de esquema terapêutico pré-operatório.

As cirurgias foram catalogadas segundo suas características. Embora existam muitas variações quanto aos tipos de cirurgia, há um princípio básico para ressecção destes tumores, que é o princípio da ressecção tridimensional. Segundo essa

orientação, devemos ressecar o tumor em bloco, contendo tecido normal no seu contorno, nos sentidos longitudinal, transversal, e em profundidade. Quando foi possível obedecer ao princípio da ressecção tridimensional, os procedimentos foram classificados como adequados. Se a ressecção foi completa, sem identificação de tumor residual macroscópico após a remoção da peça, porém as margens macroscópicas não foram amplas, a ressecção foi classificada como marginal (junto à pseudo-cápsula do tumor, porém sem violação da mesma). Se a ressecção foi adequada na quase totalidade dos contornos do tumor, mas houve área onde a ressecção foi marginal, a cirurgia foi classificada como marginal. Caso houvesse tumor residual macroscópico após a remoção da peça e o paciente foi submetido a cirurgia preservadora, a ressecção deveria ser classificada como inadequada. Portanto, a classificação das operações foi feita pelo cirurgião ao final dos procedimentos, sem conhecimento da determinação microscópica das margens, em adequada, marginal ou inadequada.

Em qualquer tipo de ressecção, excetuando-se as amputações e desarticulações, foram colocados cliques metálicos delimitando o leito tumoral para melhor planejamento da radioterapia pós-operatória.

3.5.3 - RADIOTERAPIA PÓS-OPERATÓRIA

Todos os pacientes deveriam ser candidatos a radioterapia pós-operatória, que se iniciaria dentro de no máximo 60 dias após a cirurgia.

O esquema de radioterapia obedeceu ao protocolo abaixo:

- Teleterapia: dose total de 65 Gy, com reduções aos 45 e 55 Gy, com fracionamento de 180 cGy/dia, 5 vezes por semana (35 sessões).

- Planejamento:

⇒ CTV_1 : leito tumoral + 5 cm no sentido longitudinal e 2 cm lateralmente. Para lesões pélvicas ou de cintura escapular, margens de 2 a 3 cm poderiam ser consideradas.

⇒ PTV_1 : $CTV_1 + 1$ cm. Dose para PTV_1 : 4.500 cGy/25 frações.

⇒ CTV_2 : leito tumoral + 2 cm.

⇒ PTV_2 : $CTV_2 + 1$ cm. Dose para PTV_2 : 2.000 cGy/10 frações.

A escolha da energia apropriada, composição de campos, uso ou não de filtros e associação com elétrons foi individualizada. Todos os campos foram tratados diariamente. Técnicas de simulação e planejamento computadorizado foram utilizadas preferencialmente.

3.6 - MONITORAÇÃO DA TOXICIDADE E AVALIAÇÕES PERIÓDICAS DURANTE A QUIMIOTERAPIA

Os critérios adotados para avaliação da toxicidade foram os critérios comuns de toxicidade “National Institute of Health” (NIH) – versão 2.0, já inseridos na ficha para coleta de dados (anexo D).

Os pacientes foram avaliados três semanas após o término de cada ciclo, cerca de uma semana antes do ciclo seguinte. Nessa ocasião, eram realizados exame físico e observação da toxicidade relacionada ao tratamento. Além de anamnese e exame

físico, eram solicitados hemograma completo, dosagem de uréia e creatinina, TGO, TGP e bilirubinas, além de exame de urina tipo I, cujos resultados eram checados antes da infusão do ciclo seguinte. Estas informações foram anotadas em ficha padronizada (anexo D)

3.7 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CLÍNICA

A avaliação da resposta à quimioterapia neoadjuvante sobre o tumor primário foi realizada segundo o critérios recomendados pelo RECIST.²⁷

Tomografias computadorizadas ou RNM do local e TC do tórax foram realizadas antes do início do tratamento, durante a fase de estadiamento, e três semanas após o término do último ciclo de quimioterapia. A opção por TC ou RNM na fase de estadiamento era de opção do cirurgião, porém a avaliação da resposta deveria ser obrigatoriamente determinada através do mesmo exame utilizado na fase de estadiamento, quer seja TC ou RNM.

Exame físico com determinação do maior diâmetro tumoral foi realizado na avaliação inicial e três semanas após o término de cada um dos três ciclos de quimioterapia previstos.

O parâmetro de avaliação da resposta adotado foi o tamanho, em milímetros, do maior diâmetro do tumor, determinado por tomografia ou RNM, ou seja, unidimensional.

Resposta completa foi considerada quando não havia evidência de tumor ativo à tomografia; a resposta foi considerada parcial quando houve diminuição maior ou igual a 30% do tamanho do maior diâmetro do tumor em comparação com a imagem

pré-tratamento; considerou-se doença estável quando a diminuição no tamanho do maior diâmetro do tumor foi menor que 30% ou se houve aumento menor que 20%. Foi considerada progressão quando foi observado aumento maior que 20% no maior diâmetro do tumor primário ou aparecimento de lesões à distância.

Para tornar dicotômica variável de estudo, consideramos:

- ⇒ Resposta objetiva **SIM**: resposta completa ou resposta parcial.
- ⇒ Resposta objetiva **NÃO**: doença estável ou progressão.

3.8 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA ANATOMOPATOLÓGICA

As margens foram avaliadas de maneira convencional e o patologista classificou a ressecção em três categorias: margens livres e amplas; margens livres, porém exíguas e margens comprometidas.

Aspecto fundamental deste protocolo foi a graduação da porcentagem de necrose e a porcentagem de células viáveis após a quimioterapia.

Para avaliação da peça cirúrgica pós-quimioterapia, foi representada uma fatia inteira do espécime cirúrgico. A fatia escolhida foi aquela com menor necrose macroscópica. Esta fatia foi mapeada e foram realizados cortes de 1 a 2 cm de toda a fatia. Ao exame microscópico, foi estabelecida a porcentagem de células viáveis e necrose em cada fragmento em relação ao total de lâminas avaliadas. Além da medida do grau de resposta à quimioterapia, os demais dados anatomopatológicos foram avaliados conforme ficha anexa (anexo E).

3.9 - VARIÁVEIS COLETADAS

As variáveis coletadas e anotadas em ficha padronizada (anexo D) foram:

- Idade
- Sexo: masculino e feminino
- Topografia da lesão: membro inferior, definida como localização distal à prega inguinal. Membro superior, definida como localização distal ao ombro. Cintura pélvica, que inclui tumores em região glútea ou em região inguinal, excluindo-se os tumores da fossa ilíaca. Cintura escapular, definida como localização no ombro, axila ou região escapular.
- Tamanho do tumor ao exame físico: medido em milímetros, durante a palpação.
- Características à palpação: tumor não palpável; tumor palpável e móvel em relação ao plano ósseo e à pele; tumor fixo em relação ao plano ósseo; infiltração da pele; diminuição de pulso arterial distal.
- Manipulação prévia: definida pelo tipo de procedimento invasivo realizado previamente à admissão. Foram classificados como: nenhuma; biópsia incisional; biópsia com agulha grossa; ressecção recente (menos de três meses antes da admissão); tumor recidivado (ressecção há mais de três meses, antes da admissão).
- Determinação do “performance status”: utilizou-se o índice de Karnofsky.
- Tipo de exame de imagem para estadiamento locorregional: TC ou RNM.
- Tamanho do tumor ao exame de imagem: medida em milímetros do maior diâmetro.

- Tipo de biópsia no Hospital A.C. Camargo: incisional ou por agulha grossa.
- Tipo histológico
- Grau histológico: utilizou-se a classificação em 3 categorias, agrupando-se o grau 1 como baixo grau e os grau 2 e 3 como alto grau. Como os tumores de baixo grau foram excluídos no desenho do estudo, a classificação envolveu apenas os graus 2 (grau intermediário) e 3 (alto grau).
- Estadiamento TNM: utilizou-se o sistema de estadiamento TNM com base nos dados dos exames de imagem e nos laudos anatomopatológicos das biópsias realizadas no Hospital A.C. Camargo. Os quadros 1 e 2 descrevem a classificação TNM.
- Datas de início de cada ciclo
- Toxicidade: o tipo e a graduação das complicações foram determinados com base nos Critérios Comuns de Toxicidade padronizados pelo *National Institute of Health* (NIH).
- Alívio de sintomas após cada ciclo: sim ou não.
- Número de ciclos de quimioterapia realizados: 0 a 4.
- Motivo da interrupção do esquema: completou os quatro ciclos; interrupção por toxicidade; interrupção por progressão tumoral.
- Medida do tumor após a quimioterapia neoadjuvante: determinado em milímetros, a partir do maior diâmetro do tumor, medido pelo mesmo exame de imagem utilizado no estadiamento (TC ou RNM).
- Determinação da resposta clínica: de acordo com os critérios RECIST, já descritos anteriormente.
- Data da cirurgia.

- Classificação da cirurgia quanto à ressecabilidade: descrição da impressão macroscópica das margens, conforme já descrito anteriormente.
- Classificação de cirurgia quanto à extensão da ressecção: 1) ressecção de partes moles com preservação do membro. 2) ressecção alargada em monobloco com estruturas adjacentes (troncos vasculares, osso ou vísceras), com preservação de membros. Nessa categoria incluem-se as hemipelvectomias internas e a cirurgia de Tickhoff-Limberg. 3) amputação ou desarticulação clássica. 4) amputação ou desarticulação alargada. Nessa categoria, incluem-se as amputações inter-ílio-abdominais e as desarticulações inter-escápulo-torácicas.
- Classificação quanto ao tipo de reconstrução: retalho fáscio-cutâneo; retalho miocutâneo; retalho microcirúrgico.
- Motivo de inoperabilidade: não houve e operou; óbito por complicação da quimioterapia; progressão local durante a quimioterapia; progressão sistêmica.
- Data da alta hospitalar.
- Complicações pós-operatórias: classificadas de acordo com a ficha padronizada (anexo D).
- Tipo de complicações pós-operatórias: descritas de acordo com a ficha padronizada (anexo D).
- Margens microscópicas: classificadas de acordo com padronização já descrita.
- Porcentagem de células viáveis: variável contínua, determinada de acordo com padronização já descrita.

3.10 - VALIDAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS AMOSTRAS

Antes de serem processadas, todas as amostras foram submetidas à análise histológica, utilizando-se o material congelado ou fixado em RNALater[®]. Esta validação visava não somente a confirmação do diagnóstico, mas também a avaliação da amostra quanto à presença de necrose, infiltrado inflamatório, estroma e tecido adiposo. Pelo fato dos sarcomas apresentarem algumas limitações relevantes, tais como o elevado índice de necrose, optamos por manter um critério mínimo de 70% do fragmento relativo à fração tumoral.

3.11 - EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

A extração do RNA total da maioria dos fragmentos tumorais foi efetuada, utilizando-se o reagente Trizol[®] (cat# 15596026 Invitrogen[™] Life Technologies, USA). Este reagente é uma solução monofásica de fenol/isotiocianato de guanidina a pH 4.5, desenvolvida por Chomczynski⁶⁶ própria para a extração de RNA total, DNA e proteínas. Este método está devidamente descrito nas publicações de Chomczynski⁶⁶; Chomczynski e Sacchi⁶⁷.

Para extração em algumas amostras, foi utilizado o kit RNEasy Midi Kit[™] (cat# 75144, Qiagen).

A avaliação da quantidade e grau de pureza do RNA total extraído foi efetuada em espectrofotômetro (GeneQuant, Clamart Cedex, França), onde se detecta absorbâncias a 230nm, 260nm e 280nm. As amostras consideradas como ótimas e livres de contaminantes prejudiciais à técnica de amplificação “in vitro”

apresentaram ratio 260/280 (entre 1.7 e 2.1) e ratio 230/260 (entre 1.8 e 2.0). Para aquelas que esta razão foi inferior ao estabelecido é realizado extrações a pH 4.5 com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 25:24:1.

A qualidade do RNA total foi avaliada pela integridade dos RNA's ribossomais 28S e 18S, após o fracionamento eletroforético de 1,0 µg de RNA total, sob condições denaturantes, em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio (4,5 µg/mL). Apenas aquelas amostras que apresentaram uma proporção dos transcritos ribossomais 28S/18S maior que um foram utilizadas no protocolo de cDNA "microarrays".⁶⁸

3.12 - AMPLIFICAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO E PREPARAÇÃO DAS SONDAS

A técnica de amplificação linear, que permite a síntese de 5' poly (U) aRNA a partir de quantidades limitadas de heterogêneos *ds*-cDNA's, foi primeiramente descrita por Van Gelder⁶⁹. Uma vez publicada, esta técnica sofreu várias otimizações^{68, 70-72}.

Em nosso grupo utilizamos o protocolo baseado na amplificação do RNA poly A⁺ pela T7 polimerase descrito por WANG et al⁷², mas com modificações baseadas nos trabalhos de Zhao⁷³; Gomes⁷⁴ e Bittner⁶⁸.

Aprimoramos a síntese do 5' poly (U) aRNA empregando o Oligo T7 - 5' AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T(24) 3' na reação de transcrição ao invés do Oligo T7 - 5' AAA CGA CGG CCA GTG AAT TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG CGC T(15) 3'.^{72,74} Esta alteração nos

proporcionou um rendimento de 1.000 a 2.000 vezes em apenas um ciclo de amplificação, o que outrora era conseguido com somente dois ciclos.

Os perfis gerados foram monitorados por eletroforese em um gel de agarose 1,0% corado com 4,5 µg/mL de brometo de etídio. O tamanho do perfil quando se emprega um ciclo de amplificação é de 2000 a 400 nts (nucleotídeos).

3.13 - RNA REFERÊNCIA

Todas as amostras foram cohibridizadas com uma referência comum como proposto por Pollack ⁷⁵, de modo a diminuir a quantidade de hibridizações. Assim, a quantidade relativa de cada mRNA numa amostra foi calculada como a razão entre a intensidade na amostra sobre a intensidade na referência; e as amostras foram comparadas entre si através da razão das razões. A referência ideal é aquela que produz um sinal mínimo em todos os elementos do “array”, além de ser facilmente produzida e reprodutível, não só no tempo, mas também em diferentes laboratórios.⁷⁵ Dessa forma, o que mais se aproxima da referência ideal seria um conjunto de linhagens celulares como o utilizado na Universidade de Stanford ⁷⁶⁻⁷⁸. Entretanto, as 11 linhagens citadas neste trabalho não estão disponíveis no Instituto Ludwig e, portanto, um novo conjunto de 15 linhagens celulares foi escolhido, tomando o cuidado de selecionar tipos celulares equivalentes.

3.14 - MARCAÇÃO INDIRETA DAS SONDAS

A marcação indireta, tanto dos 5' poly (U) aRNA's em estudo quanto do 5' poly (U) aRNA referência, foi realizada conforme o protocolo descrito por COX et al, com algumas modificações.⁷⁹ Resumidamente, 6,0 µg de 5' poly (U) aRNA é transcrito em presença do *random primer* (dN6; Amersham Pharmacia Biotech, UK) e da molécula 5-(3-aminoallyl)-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (aa-dUTP) (cat# A0410, Sigma). Esta metodologia possibilita a incorporação enzimática da molécula aa-dUTP à molécula de cDNA, que após precipitação e lavagens em etanol a 75% (v/v), é então solubilizado em solução de bicarbonato de sódio a 0,065M pH 9.0 e fracionado em duas distintas reações de acoplamento, relativas à incorporação química das moléculas fluorescentes amino-reativas: os ésteres succinidimil alexa-fluor 555 e 647 (cat # A32755, Molecular Probes – Invitrogen®).⁷⁹

3.15 - HIBRIDIZAÇÃO E DIGITALIZAÇÃO DAS IMAGENS

As etapas de pré-hibridização, hibridização e lavagem das lâminas foram realizadas conforme descrito por Bittner⁶⁸, com algumas adaptações.

A plataforma utilizada foi a lâmina de vidro ILPC-4.8-03, que contém 4.608 seqüências de cDNA ORESTES (“Open Reading Frames EST Sequences”), originárias do Projeto Genoma do Câncer. Essa lâmina foi desenvolvida pela parceria entre o Instituto Ludwig e o Hospital A.C. Camargo, sob responsabilidade do Dr. Alex Fiorini de Carvalho e do Dr. Luiz Fernando Lima Reis.

Os sinais gerados pela hibridização foram capturados por scanner confocal a laser (ScanArrayTM Express Microarray Acquisition System – Packard BioScience Biochip Technologies), usando-se uma resolução de 10 microns e sensibilidade de captação PMT de 60%.

Os principais valores de interesse produzidos pelo método de análise da imagem (segmentação e correção do *background*) foram os pares de intensidade (R, G) para cada cDNA ORESTES (“Open Reading Frames EST Sequences”) em cada “array”. Cada hibridização produziu um par de imagens 16-bit TIFF (“Tagged Information File Format”) que foram processadas aplicando-se o método Histograma do software ScanArrayTM Express – Packard BioScience Biochip Technologies.

Após a análise da imagem, para cada cDNA ORESTE da lâmina ILPC-4.8K, denotamos como “dado de expressão” os dois valores de intensidade (R, G). Desta forma, o “composite” da imagem alexa-fluor 555 (GREEN) versus alexa-fluor 647 (RED) reflete, em termos de intensidade da coloração verde-vermelha, a abundância relativa daquele particular cDNA ORESTE avaliado.

3.16 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram transcritos em ficha padronizada (anexo 4) e digitados em computador para gerenciamento do banco de dados. A confecção do banco de dados e as análises foram feitas no programa estatístico “SPSS 8.0 for Windows”.

A análise estatística das variáveis e desfechos clínicos do estudo foi puramente descritiva e realizada através de determinação das frequências simples das variáveis e

desfechos. Não fazia parte dos objetivos do estudo a aplicação de testes de associação ou de análises de regressão sobre as variáveis clínicas.

O controle de qualidade das amostras hibridizadas foi feito através da análise dos gráficos gerados tipo MM “plot”, que calculam a correlação de Pearson entre os “spots” da lâmina controle (“main”) e os da lâmina “swap”. Quanto mais próximo de 1 for o resultado, melhor é a correlação entre as lâminas.

A avaliação do perfil de expressão gênica entre as amostras foi feita mediante aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas, que além de nos possibilitarem a identificação diferencial entre estes perfis, conseguem avaliar a significância dos resultados obtidos.

Os vários métodos matemáticos e estatísticos que foram utilizados neste projeto estão descritos e disponíveis “on line” na página do Laboratório de Biologia Computacional do Hospital do Câncer (<http://lbc.ludwig.org.br>) e do IME pelo sistema “Mathematical Analysis of Interacting Gene Expression Systems” (<http://www.maiges.org>) e usando o programa TMEV (Tger).

Sucintamente, as análises matemáticas e estatísticas são realizadas com linguagem computacional e gráfica R do *Contributed R Archive Network* (CRAN, <http://cran.r-project.org>) que promove implementações estatísticas e gráficas, incluindo modelos lineares e não-lineares, “clusters”, predições, análises “resampling survival” e “time-series”.

Estes métodos utilizam a comparação indireta entre uma série de tumores, utilizando-se um RNA referência comum conforme descrito anteriormente. Além disso, os genes diferencialmente expressos são identificados considerando-se: 1) a razão de intensidade M^* em amostras comparadas; 2) os valores estatísticos

determinados por teste t de Student permutado entre duas classes, não pareado, com aproximação de Welch, assumindo-se variâncias não iguais entre os grupos; e ainda, 3) correção para múltipla verificação por Bonnferroni ajustado.

Os métodos de agrupamentos de amostras foram “clusterização” hierárquica, usando a distância da correlação de Pearson, e “complete linkage”.

Os genes identificados como diferentemente expressos em nossa análise foram posteriormente pesquisados nos bancos de dados públicos, disponíveis no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene>. Para isso, selecionamos os genes com diferença de expressão em número de vezes maior que três.

Para identificação das vias moleculares e metabólicas em que os genes identificados em nossa análise encontram-se envolvidos, utilizamos o aplicativo “Pathway Express”, disponível no site <http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress/>. Resumidamente, ao submetermos a lista de genes identificados como diferentemente expressos em nossa análise e a lista total de genes contidos em nossa lâmina, o programa procura as vias com maior proporção entre número de genes diferentemente expressos e o total de genes pertencente àquela via representados na plataforma utilizada, utilizando para tal o valor de p do teste t.

3.17 - FINANCIAMENTO

O estudo foi financiado pelo programa CEPID, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

4 - RESULTADOS

4.1 - DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Entre janeiro de 2005 e novembro de 2006, 43 pacientes portadores de sarcomas de partes moles em extremidades, incluindo cintura pélvica e escapular, foram admitidos para tratamento no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C. Camargo, em São Paulo.

Vinte e dois pacientes eram potencialmente elegíveis para o estudo. Três pacientes com diagnóstico prévio de sarcoma de alto grau foram excluídos após a biópsia em nossa instituição ter revelado outra histologia (dois eram tumores de baixo grau e um era um tumor neuroectodérmico primitivo em partes moles); dois pacientes foram excluídos após terem seu “performance status” reclassificado pelo Departamento de Oncologia Clínica e considerados inelegíveis em função da idade avançada; um paciente não aceitou a inclusão no protocolo e optou pelo tratamento convencional por radioquimioterapia; um paciente foi excluído por ter iniciado quimioterapia neoadjuvante em outra instituição, com doses diferentes da preconizada no protocolo; um paciente foi excluído por falha de protocolo em nossa instituição (iniciou quimioterapia com gencitabina e paclitaxel).

Quatorze pacientes foram elegíveis e incluídos no protocolo. A tabela 5 resume as características clínicas dos 14 pacientes.

Entre os 14 pacientes da amostra, a idade mediana foi de 39 anos, variando de 16 a 61 anos.

Em relação ao sexo, seis (43%) eram do sexo masculino e oito (57%), do sexo feminino.

Quanto à topografia da lesão, sete (50%) tumores se localizavam no membro inferior; quatro (28,6%), no membro superior; dois (14,3%) em cintura escapular e um (7,1%) em cintura pélvica.

Ao exame clínico, todos os pacientes relatavam o aparecimento de tumor como primeiro sinal, mas 10 pacientes (71%) relatavam a dor como sintoma mais importante no momento da avaliação inicial. Ao exame físico, o tamanho mediano do maior diâmetro do tumor, em milímetros, foi de 135 mm, variando de 60 a 300 mm. Em dois pacientes os tumores foram descritos como móveis em relação ao plano ósseo e à pele e em 12 pacientes o tumor se apresentava fixo ao plano ósseo, sendo que dois pacientes apresentavam sinais de infiltração concomitante da pele.

Cinco pacientes (35,7%) foram admitidos sem nenhuma manipulação invasiva diagnóstica ou terapêutica prévia. Seis pacientes haviam sido submetidos previamente a algum procedimento de biópsia, sendo quatro por biópsia incisional e dois por biópsia com agulha grossa. Três pacientes foram admitidos com tumores recidivados após ressecções cirúrgicas prévias.

Tabela 5 - Características clínicas dos 14 pacientes incluídos no estudo

Variável		n (%)
Idade mediana (anos)		39 (16 – 61)
Gênero	masculino	6 (43%)
	feminino	8 (57%)
Topografia	membro inferior	7 (50%)
	membro superior	4 (28,6%)
	cintura escapular	2 (14,3%)
	cintura pélvica	1 (7,1%)
Tamanho mediano (mm)		135 (60 – 300)
Manipulação prévia	intacto	5 (35,7%)
	biópsia incisional	4 (28,6%)
	biópsia por agulha grossa	2 (14,3%)
	recidivado	3 (21,4%)

4.2 - DADOS DO DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO E DO ESTADIAMENTO

O exame de imagem para avaliação locorregional foi a RNM em nove casos e a TC em cinco casos.

O tamanho mediano dos tumores, medido em milímetros pelo exame de imagem, foi de 130 mm, variando de 48 a 250 mm.

Realizamos biópsia incisional em sete pacientes e biópsia com agulha grossa guiada por TC no outros sete.

Quanto ao tipo histológico, seis tumores (42,9%) eram sarcomas sinoviais, quatro (28,6%) foram diagnosticados como sarcomas pleomórficos, três (21,4%)

eram leiomiossarcomas e um caso de sarcoma fusocelular. De acordo com a graduação histológica, apenas um tumor foi classificado como grau 2 e todos os outros 13 casos, classificados como grau 3.

Ao final do estadiamento, oito (57%) pacientes foram classificados no estágio III; cinco (36%), estágio IVb, sendo os cinco com metástases pulmonares, e um paciente no estágio II.

A tabela 6 descreve os dados anatomopatológicos e do estadiamento dos 14 pacientes.

Tabela 6 - Estadiamento dos 14 pacientes incluídos no estudo

caso	Tipo	T	N	M	grau	Estádio
histológico						
1	pleomórfico	T2b	0	0	3	III
2	leiomiossarcoma	T1b	0	0	2	II
3	leiomiossarcoma	T2b	0	1	3	IVb
4	Sinovial	T2b	0	1	3	IVb
5	Sinovial	T2b	0	0	3	III
6	Sinovial	T2b	0	0	3	III
7	Sinovial	T2b	0	0	3	III
8	fusocelular	T2b	0	0	3	III
9	pleomórfico	T2b	0	0	3	III
10	Sinovial	T2b	0	1	3	IVb
11	pleomórfico	T2b	0	0	3	III
12	pleomórfico	T2b	0	0	3	III
13	Sinovial	T2b	0	1	3	IVb
14	leiomiossarcoma	T2b	0	0	3	III

4.3- DADOS DO TRATAMENTO PRÉ-OPERATÓRIO

4.3.1- ADESÃO AO PROTOCOLO

Não houve abandono de tratamento. Dez pacientes completaram os quatro ciclos previstos. Três pacientes interromperam a quimioterapia por apresentarem sinais de progressão de doença e um teve o tratamento suspenso por toxicidade.

Entre os pacientes que não completaram os quatro ciclos, dois realizaram dois ciclos e dois interromperam o esquema após três ciclos.

4.3.2 - TOXICIDADE

Entre os 14 pacientes tratados, seis apresentaram toxicidade grau 4; um apresentou toxicidade grau 3; seis apresentaram toxicidade grau 2 e um paciente teve apenas toxicidade grau 1. Não houve óbito relacionado a complicações da quimioterapia.

Entre as complicações grau 3 e 4, neutropenia febril ocorreu em cinco casos; anemia em dois casos; e distúrbio metabólico em um caso (hiperglicemia e hipercolesterolemia severas durante a quimioterapia em paciente sem diagnóstico prévio de diabetes ou dislipidemia). Um paciente apresentou hemorragia intratumoral grave na vigência de anticoagulação (trombose venosa profunda), durante o primeiro ciclo de quimioterapia e evoluiu para óbito. A contagem de plaquetas era normal. Tratava-se de um grande tumor em cintura pélvica, associado a trombose da veia ilíaca externa por envolvimento tumoral. Atribuímos este óbito à complicação diretamente relacionada à progressão tumoral e não ao tratamento.

Entre as complicações grau 1 e 2, as mais frequentes foram alopecia (100%), náuseas e vômitos.

A tabela 7 descreve as frequências de todas as complicações relacionadas à quimioterapia.

Tabela 7 - Complicações ocorridas durante o tratamento pré-operatório

Grau de toxicidade	Descrição (n)
0	—
1	Náusea (8); vômitos (6); estomatite (5); elevação de transaminases (3); anemia (2); neutropenia (3); plaquetopenia (1); infecção (1); diarreia (2)
2	Alopécia (14); infecção (5); náusea (4); vômitos (4); diarreia (4); estomatite (3); anemia (4); arritmia cardíaca (1); elevação de transaminases (1)
3	Anemia (1); neutropenia (1); infecção (1)
4	Neutropenia (4); anemia (1), hemorragia (1); hiperglicemia (1); hipercolesterolemia (1)

4.3.3 - RESPOSTA CLÍNICA À QUIMIOTERAPIA

Entre os 14 pacientes, em 10 houve relato de melhora clínica após o término do tratamento neoadjuvante, descrita como alívio de sintomas e/ou alteração de mobilidade da lesão ao exame físico.

Em relação à determinação da resposta objetiva segundo os critérios RECIST, observamos doença estável em sete casos, progressão de doença em três e resposta parcial em quatro casos. Nenhuma resposta completa foi observada aos exames de imagem.

Entre os três casos de progressão durante a quimioterapia, um caso apresentou progressão local e foi submetido a tratamento convencional com radioquimioterapia, quando se obteve resposta objetiva significativa, seguido por cirurgia com preservação do membro. O segundo caso apresentou progressão local e pulmonar e optou-se pela ressecção paliativa do tumor. O outro caso evoluiu com rápida progressão local e hepática e óbito por hemorragia intratumoral.

Um paciente com doença estável após a quimioterapia de indução também foi tratado com radioquimioterapia pré-operatória na tentativa de se obter resposta suficiente para preservação do membro. Nesse caso, não houve resposta objetiva também após a radioterapia.

Figura 3- Exemplo de progressão de doença, segundo o critério RECIST: as figuras A e B são referentes à RNM pré-quimioterapia em T1 antes e após administração de contraste, respectivamente. As figuras C e D são referentes à RNM pós-quimioterapia, no mesmo sinal em T1 antes e após administração de contraste. Nesse caso, houve aumento em 43% no maior diâmetro do tumor

4.4 - DADOS REFERENTES À CIRURGIA

Entre os 14 pacientes tratados, apenas um não foi operado em função de rápida progressão local e sistêmica.

Entre os 13 pacientes operados, um deles, portador de um sarcoma de mão, teve que ser submetido à amputação.

Dez pacientes foram submetidos a ressecções envolvendo partes moles e três foram submetidos a ressecções alargadas (duas ressecções de troncos vasculares com substituição vascular e uma cirurgia de Tickhoff-Limberg).

Em relação às margens macroscópicas, cinco cirurgias foram classificadas como adequadas, sete como ressecções marginais e uma ressecção incompleta.

Retalho miocutâneo foi utilizado em um caso e em nenhuma cirurgia foi necessária reconstrução com retalho microcirúrgico.

Complicações relacionadas à ferida operatória ocorreram em três casos entre os 13 pacientes operados (23%) e consistiram em infecção e deiscência parcial em dois casos e sangramento com necessidade de reoperação em um caso. Os dois casos de deiscência foram tratados através de curativos e uso de antibióticos, com resolução satisfatória, sem determinar atraso da radioterapia pós-operatória.

4.5 - DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS DAS PEÇAS OPERATÓRIAS

A avaliação anatomopatológica dos espécimes cirúrgicos revelou margens microscópicas livres em nove peças. Em duas delas, as margens foram consideradas

livres, porém focalmente exíguas. Margem microscópica comprometida foi encontrada em dois casos.

A porcentagem de células neoplásicas viáveis nas peças teve uma mediana de 18,5%, variando de 0 a 99%. Três casos apresentaram porcentagem de células viáveis menor que 5% após o tratamento neoadjuvante, sendo que em dois casos não havia células neoplásicas viáveis na peça operatória. Porém, um dos dois casos de resposta patológica completa ocorreu em um paciente que realizou radioterapia pré-operatória após ausência de resposta clínica (doença estável) com a quimioterapia.

A figura 4 exemplifica um caso de resposta completa e a tabela 8 descreve os padrões de resposta clínica e anatomopatológica dos 14 pacientes.

Figura 4- Exemplo de um leiomiossarcoma com resposta completa após quimioterapia. A – lâmina da biópsia pré-tratamento. B – lâmina da peça operatória, exibindo substituição completa por infiltrado inflamatório e hialinização, sem células neoplásicas viáveis

Tabela 8 - Padrões de resposta clínica e patológica de 14 pacientes tratados

Caso	Exame de imagem	Tamanho pré-qt (mm)	Tamanho pós-qt (mm)	Resposta clínica (RECIST)	Células viáveis (%)
1*	RNM	80	115	PD	12,8
2	RNM	48	35	DE	80,0
3	RNM	110	150	PD	72,4
4	RNM	90	60	RP	19,5
5	TC	220	240	DE	17,6
6	TC	90	100	DE	55,8
7*	TC	250	210	DE	0
8	RNM	100	85	DE	66,6
9	RNM	140	145	DE	99,0
10	RNM	220	220	DE	8,6
11	TC	195	65	RP	2,6
12	RNM	210	210	PD	não operou
13	RNM	120	72	RP	50
14	TC	180	30	RP	0

* realizaram radioterapia pré-operatória. PD: progressão de doença; DE: doença estável; RP: resposta parcial; RC: resposta completa

4.6 - DADOS DO SEGUIMENTO

O tempo de seguimento mediano dos 14 pacientes analisados até o momento é de 10,7 meses, variando de 1,7 a 26,4 meses.

Entre os pacientes que apresentavam metástases à admissão, um evoluiu para óbito. Dois pacientes foram submetidos a ressecção completa das metástases pulmonares e estão em seguimento, assintomáticos. Um paciente está vivo e em tratamento sistêmico de segunda linha para metástases pulmonares.

Entre os pacientes que apresentavam doença localizada à admissão, três evoluíram com metástases. Um apresentou metástases hepáticas durante a fase de quimioterapia e faleceu por progressão de doença. Um paciente apresentou recidiva em linfonodos regionais quatro meses após a cirurgia e foi resgatado através de linfadenectomia axilar, mas teve nova recaída pulmonar. Outro paciente evoluiu também com metástase pulmonar.

A tabela 9 resume os dados atuais de seguimento dos 14 pacientes.

Tabela 9 - Dados do seguimento atual dos 14 pacientes tratados.

Caso	Estádio inicial	Padrão de resposta	Recidiva / progressão	Status atual	Seguimento (meses)
1	III	PD	não	Vivo sem doença	26,4
2	II	DE	não	Vivo sem doença	16,5
3	IVb	PD	pulmão	Óbito	8,6
4	IVb	RP	pulmão	Vivo com doença	20,7
5	III	DE	não	Vivo sem doença	18,6
6	III	DE	linfonodos	Vivo com doença	18,5
7	III	DE	não	Vivo sem doença	16,3
8	III	DE	pulmão	Vivo sem doença*	11,2
9	III	DE	não	Vivo sem doença	10,0
10	IVb	DE	pulmão	Vivo com doença	6,2
11	III	RP	não	Vivo sem doença	10,2
12	III	PD	fígado	Óbito	1,8
13	IVb	RP	pulmão	Vivo sem doença*	7,1
14	III	RP	não	Vivo sem doença	7,0

* ressecção de metástase.

4.7 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.7.1 - EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO, HIBRIDIZAÇÃO E NORMALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Das 14 amostras coletadas, sete foram descartadas: cinco na validação histopatológica, uma na validação da qualidade do RNA total; e uma após a amplificação.

Das sete amostras restantes, três foram aprovadas somente após segunda tentativa de extração e amplificação.

Entre as sete amostras hibridizadas, em seis conseguimos uma boa qualidade de lâminas “main” e “swap” analisadas, ambas apresentando “background” satisfatório (< 160 para um diâmetro de $699\ \mu\text{m}$), conforme ilustrado na figura 5.

Figura 5 - “cDNA microarrays” após digitalização das imagens: “composite” das lâminas ILPC-4.8K dos experimentos “main” (A) e “swap” (B) após hibridização de cDNA’s referentes à amostra SS183 (caso 4)

O controle de qualidade das amostras hibridizadas foi feito através da análise dos gráficos tipo MM “plot”, ilustrado na figura 6. Uma das sete amostras teve que ser descartada, mesmo após a normalização. As outras seis amostras apresentaram

coeficientes de Pearson entre 0,78 e 0,95 e foram utilizadas para análise do perfil de expressão gênica.

Figura 6 - Exemplo de gráficos utilizados para controle de qualidade das amostras, antes e após a normalização

4.7.2 - ANÁLISE DOS DADOS

As seis amostras analisadas correspondem aos casos: 3, 4, 8, 9, 11 e 12.

Inicialmente, avaliamos o comportamento geral das amostras através de um “cluster” hierárquico (figura 7) para ambos os experimentos “main” e “swap”. Vale ressaltar que os dados antes de serem “clusterizados” foram filtrados excluindo pontos vazios, cDNA’s de controle interno e “flags”. Conforme observamos no dendograma da figura 4, a amostra SP186, referente ao caso 9, apresentou agrupamento independente do tipo de experimento, ou seja, a amostra “main” se agrupou não com seu “swap” correspondente, mas com outro. Este tipo de comportamento não implica em erro experimental, mas se deve ao próprio método de “clusterização” que se baseia em similaridade hierárquica não-supervisionada, que não consegue separar pequenas diferenças entre as amostras. Essa primeira

“clusterização” não separou as amostras entre respondedores e não respondedores à quimioterapia.

Figura 7 - “cluster” hierárquico não supervisionado das amostras controles e “swaps” baseado na expressão de todos os genes da lâmina

Após aplicação do teste t, identificamos 222 genes e seqüências diferentemente expressos entre os grupos de respondedores (resposta parcial) e não-respondedores (doença estável e progressão de doença) à quimioterapia pré-operatória, o que corresponde a 5% de todos os genes e seqüências presentes na plataforma utilizada. Entre os 222 genes e seqüências, 196 correspondem a genes conhecidos.

A figura 8 mostra o resultado da “clusterização” hierárquica após aplicação do teste t e o agrupamento diferencial entre os respondedores e não respondedores.

Figura 8- “Clusterização” com as 222 seqüências selecionadas após aplicação do teste t: agrupamento das amostras de acordo com o perfil de expressão entre respondedores e não respondedores. LES182A-**caso 3**; SP186A-**caso 8**; SP188A-**caso 9**; SP191A-**caso 12**; SS183A-**caso 4**; SP190A-**caso 11**

Analizamos individualmente os genes que apresentaram maior expressão no grupo de não respondedores (grupo A no anexo F), comparativamente ao grupo de respondedores (grupo B no anexo F). Determinamos como ponto de corte os genes com diferença de expressão em número de vezes (“fold”) maior ou igual a 3 na relação A/B, ou seja, diferença de expressão três vezes maior nos não respondedores em relação aos respondedores. As tabelas 10 e 11 mostram os genes identificados com expressão aumentada entre os não respondedores e entre os respondedores, respectivamente.

Tabela 10 - Genes com expressão aumentada nos tumores considerados resistentes a quimioterapia com doxorubicina e ifosfamida, comparativamente às amostras de tumores respondedores (sensíveis à quimioterapia)

Símbolo	Nome	Função	“Fold” A/B
EDIL3	Del1	A proteína codificada é um ligante de $\alpha v \beta 3$ integrina. Tem importante papel em mediação de angiogênese e na remodelação e desenvolvimento de parede de vasos.	10,4
PLAUR	Receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase	O gene codifica um receptor para ativador de plasminogênio tipo uroquinase. Influencia em muitos processos normais e patológicos de degradação de matriz extracelular	8,6
MMP11	Estromelisina 11	Degradação de matriz extracelular	6,4
MMP13	Colagenase 3	Degradação de matriz extracelular	4,3
GAS1	Bloqueador de replicação específico 1	Gene supressor de tumor, que age bloqueando a entrada em fase S	4,2
SGK1	Quinase reguladora de glucorticóide	Codifica uma serina / treonina quinase. Sua expressão aumentada em hepatócitos, induzida por TGF β , está envolvida com complicações do diabetes	4,2
BCAT1	Aminotransferase de cadeia 1	Envolvido com catalização de transaminação de aminoácidos. Apresenta interações com SMAD5	3,6
FST	Folistatina	Codifica uma proteína gonadal de cadeia única que inibe a liberação de FSH. Está envolvido nas vias de sinalização do TGF β 1	3,3
PKIG	Inibidor de proteína quinase gama	Inibidor de proteína quinase dependente de AMP cíclico	3,3
TGF β 1	Fator transformador de crescimento beta 1	Codifica um peptídeo multifuncional que controla proliferação, diferenciação e muitas outras funções.	3,0

Tabela 11 - Genes com expressão aumentada nos tumores considerados sensíveis a quimioterapia com doxorubicina e ifosfamida, comparativamente às amostras de tumores resistentes (não respondedores)

Símbolo	Nome	Função	“Fold” A/B
HES1	Prolongador do segmento 1 (Drosophila)	Fator de transcrição envolvido com a via “notch” de sinalização	-6,4
AFF3	AF4 / FMR2	Fator de transcrição expreso preferencialmente em tecido linfóide	-5,9
EDN3	Endotelina 3	Codifica um peptídeo vasoativo envolvido em vários processos biológicos e desenvolvimento neural.	-4,8
TRPS1	TRPS1	Pró-apoptose	-4,7
NTRK2	Receptor tipo 2 de tirosina quinase neurotrófica (TrkB)	Diferenciação celular. Fosforila membros da família das MAP quinases	-4,1
TLE1	Prolongador do segmento 1 tipo transducina (Drosophila)	—	-3,8
SOX8	Determinador sexual de região Y	Fator de transcrição envolvido desenvolvimento embrionário do sistema nervoso central	-3,7
CX3CL1	Ligante 1 de quimioquina	Mediação de resposta inflamatória	-3,6
AREG	Anfirregulina	Fator de crescimento da família EGF	-3,3
NET1	Transformador de célula neuroepitelial 1	Organização do citoesqueleto	-3,1

A submissão da lista de genes diferentemente expressos em nossa análise ao programa Pathway-express, disponível no site <http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress/>, revelou a via de sinalização regulada por TGF β como significativamente alterada entre os tumores respondedores, em relação aos não respondedores à quimioterapia. A figura 9 esquematiza a via de sinalização regulada pelo TGF β e identifica os genes com diferença de expressão em nossa análise.

Figura 9- Representação esquemática da via de sinalização regulada por TGF β . As setas vermelhas apontam para os genes que apresentam diferença significativa de expressão entre os respondedores e os não respondedores

8- DISCUSSÃO

A análise de expressão gênica das seis amostras de sarcomas de partes moles de alto grau histológico de pacientes adultos submetidos a quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ifosfamida identificou um grupo de genes diferentemente expressos entre os dois tumores que responderam ao tratamento, ou seja, sensíveis à quimioterapia, comparativamente aos outros quatro considerados não respondedores, ou seja, resistentes à quimioterapia. Apesar de bastante interessantes, esses resultados devem ser vistos com cautela e considerados apenas preliminares, em razão do reduzido número de casos.

O grande ponto negativo do presente estudo é o tamanho da casuística. A raridade da doença estudada proporciona grande dificuldade para recrutamento de pacientes em um estudo prospectivo, principalmente quando os critérios de inclusão e exclusão são bastante restritivos. O ideal para um trabalho que envolve neoplasia rara é a condução de um estudo multicêntrico, como era de fato o delineamento do nosso projeto original, que previa a participação de cinco instituições brasileiras. Porém, as outras quatro instituições abandonaram o estudo após o início do mesmo por motivos diversos, entre os quais a dificuldade de adesão ao esquema terapêutico em investigação. Este problema por nós vivenciado, associado ao reduzido número de estudos multicêntricos conduzidos no país, exceção feita à pesquisa clínica patrocinada pela indústria farmacêutica, aponta para dificuldade de colaboração científica interinstitucional no Brasil.

Outro fator que contribuiu para o pequeno número de amostras disponíveis para o estudo molecular foi a elevada taxa de perda de quase 60%, bem maior do que por nós esperada. Perdemos amostras ainda na fase de validação histopatológica, onde os fragmentos já demonstravam grande quantidade de necrose e pequena quantidade de neoplasia viável, insuficiente para extração de RNA. Essa taxa de perda particularmente nos surpreendeu porque em quase todas as biópsias houve confirmação por exame de congelação de que a região biopsiada era realmente neoplasia e não necrose. Além disso, todas as coletas foram supervisionadas e/ou realizadas pelo próprio investigador. O tipo de biópsia, a céu aberto ou com agulha grossa, não influenciou na qualidade das amostras.

Optamos pela utilização de uma plataforma construída na própria instituição, ao invés da aquisição de uma plataforma comercial. O primeiro motivo para tal decisão foi a disponibilidade de tecnologia e infra-estrutura na instituição que permitira a construção de uma lâmina própria, evitando-se o custo adicional com a compra de outra plataforma. Apesar de possuir um número de genes menor que o da maioria das plataformas disponíveis no mercado, a representatividade e a relevância das seqüências representadas na lâmina ILPC 4.8 já foram validadas em várias publicações.^{47,80,81} A ótima intensidade do sinal normalmente obtido com hibridizações com a lâmina ILPC 4.8 é resultado dos critérios utilizados na construção da lâmina, conforme descrito por Brentani et al⁴⁷: seqüências ORESTES correspondentes a seqüências de comprimento total (“full length”); seqüências ORESTES com tamanho maior que 300 pares de bases; uniformidade de tamanho e de conteúdo GC; seqüências ORESTES localizadas o mais próximo possível da extremidade 3’; não compartilhamento de seqüências com identidade maior que 85%

quando comparada com quaisquer fragmentos de até 100 pares de bases do genoma humano.

Entre os genes que apresentaram maior diferença de expressão entre os dois grupos, ou seja, respondedores contra não respondedores, identificamos alguns cuja função conhecida consideramos relevantes.

O gene que apresentou expressão mais elevada entre os tumores não respondedores à quimioterapia com doxorrubicina e ifosfamida, em comparação com os respondedores foi o gene conhecido com Dell. Esse gene codifica uma proteína de matriz extracelular que é expressa transitoriamente em células endoteliais, durante o período de desenvolvimento embrionário.⁸² A proteína possui domínios semelhantes a fator de crescimento epidérmico (EGF) que ativam o receptor de $\alpha v \beta 3$ integrina. Essa interação regula adesão e migração de células endoteliais e tem potente atividade angiogênica.⁸³ Estudos experimentais já demonstraram que células de tumores sólidos humanos são capazes de reativar a expressão de Dell e criar uma situação autócrina de indução de angiogênese através de ativação de vias de sinalização de integrinas, independente de outros fatores de crescimento.⁸⁴

Três genes identificados com expressão aumentada entre os não respondedores estão envolvidos diretamente com degradação de matriz extracelular: o receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase e as metaloproteases 11 e 13.

O receptor do ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPAR) se liga a uma pró-uroquinase inativa e a converte em uma protease ativa na superfície da membrana celular.⁸⁵ Essa protease é responsável pela conversão do zimogênio inativo plasminogênio na enzima ativa plasmina. Esta última degrada fibrina intravascular, assim como matriz extracelular, mas também é capaz de ativar ou

liberar fatores de crescimento, como TGF β e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e algumas metaloproteases.⁸⁵ Ao ativar diferentes vias de sinalização, o uPAR participa não só do processo de degradação de matriz, mas também de indução de angiogênese e proliferação. O uPAR apresenta expressão aumentada em vários tumores, incluindo leucemias, tumores de mama, pulmão, bexiga, cólon, pâncreas e cérebro.⁸⁶ Ensaios experimentais em camundongos já demonstraram que o uso de inibidores de uPAR foram capazes de evitar invasão e metástases.^{87,88}

As metaloproteases de matriz (MMP's) 11 e 13 pertencem a uma família de endopeptidases dependentes de zinco sabidamente associadas a invasão e metástases. Expressão aumentada de MMP's já foi descrita em quase todos os tipos de tumores e a superexpressão normalmente confere pior prognóstico. Apesar de seu mecanismo de ação principal, a degradação de proteínas estruturais, estar diretamente associado à invasão local, as MMP's, ao interagirem com fatores de crescimento ou seus receptores, como TGF β e VEGF, têm importante papel pró-angiogênico.⁸⁹

Com exceção do gene GAS1, que é um gene supressor de tumor, envolvido no ciclo celular, e do fator transformador de crescimento β 1, os outros genes identificados e descritos da tabela 10 não têm sido relatados, pelo menos de forma relevante, em processos de tumorigênese, invasão ou metástases. A importância em se relatar a expressão diferencial de genes que, pelo menos à luz dos conhecimentos atuais, não têm relação com os processos biológicos diretamente envolvidos com neoplasias malignas reside no fato de que a expressão conjunta desses genes pode conferir uma assinatura genética capaz de identificar um comportamento biológico aparentemente sem relação com a função individual conhecida de cada gene. No caso dos genes SGK1, BCAT1 e FST, apesar de apresentarem funções conhecidas pouco

relacionadas com neoplasias, todos têm interação com a via de sinalização mediada por TGF β .

O gene HES1, que apresentou expressão mais alta entre os tumores respondedores à quimioterapia, é um fator de crescimento envolvido na via “notch” de sinalização. Essa é uma via ancestral bastante conservada na evolução das espécies e regula sinais intercelulares entre células adjacentes e parece ter funções importantes durante o desenvolvimento.⁹⁰ O gene HES1 parece estar envolvido com diferenciação de células mesenquimais totipotentes.⁹¹ É interessante observar que o próprio gene Notch1, o principal ligante dessa via, aparece entre os genes diferentemente expressos entre os tumores respondedores, porém com baixa diferença de expressão (anexo F). Outros três genes associados com desenvolvimento aparecem entre aqueles com expressão mais aumentada entre os tumores sensíveis à quimioterapia: o AF4, a endotelina 3 e o SOX8.

Entre os genes superexpressos nos tumores respondedores à quimioterapia, nos pareceu lógico o aparecimento de um gene pró-apoptótico, o TRPS1, e um gene envolvido com mediação de resposta inflamatória, o ligante de quimioquina. Por outro lado, outros três genes superexpressos nesse grupo estão associados a maior agressividade tumoral, como o NET1, o TrkB e o AREG. Como já comentamos anteriormente, muitas vezes a função conhecida de um gene pode não ter relação direta com o comportamento esperado em situações específicas, como resposta à quimioterapia, mas um conjunto de alterações pode funcionar como uma assinatura genética independente da função individual conhecida de cada gene individualmente. Em relação a esses três genes, o fato de estarem associados a maior potencial de proliferação e invasão pode significar um substrato melhor para ação de drogas

citotóxicas. Os três genes já foram apontados, em ensaios experimentais, como possíveis alvos para terapias direcionadas.^{92,93,94}

Para tentarmos identificar uma via de sinalização que estivesse diferentemente alterada nos tumores respondedores em relação aos não respondedores utilizamos o aplicativo “Pathway Express”, disponível no site já descrito previamente. Essa análise, também conhecida como análise “Kegg”, identificou a via de sinalização mediada por TGF β como a única significativamente alterada. Essa via tem atividade supressora de proliferação em células epiteliais, mas passa a promover invasão e metástases durante a progressão tumoral. A perda de resposta ao efeito inibitório da via está associada ao aumento de expressão dos ligantes no microambiente tumoral ou a mutações nos receptores de membrana.⁹⁵ Resumidamente, os ligantes são ativados na matriz extracelular ou na superfície da membrana e então se ligam ao domínio extracelular dos receptores tipo II, formando homodímeros de alta afinidade. Os complexos formados ativam os receptores tipo I, que resulta em fosforilação de uma serina-treonina-quinase. A formação desses complexos determina a ativação de várias vias de sinalização intracelular subsequentes, a depender do tipo de tecido. Essa rede de vias de sinalização regula funções e capacidades múltiplas, como: inibição de crescimento; apoptose; senescência; diferenciação; supressão de tumor; transformação; proliferação; promoção de tumor; resistência à resposta imune; migração; invasão e angiogênese.⁹⁵ A metodologia empregada em nosso estudo permitiu apenas identificar que essa via se encontrava significativamente alterada na comparação entre tumores respondedores e não respondedores à quimioterapia, mas não permite determinar exatamente que funções

ou capacidades esses tumores perderam ou adquiriram, dada a multiplicidade funcional da via.

Poucos estudos se propuseram a avaliar o perfil de expressão gênica de sarcomas de partes moles de adultos. Um dos três estudos publicados que envolvem grandes casuísticas é o trabalho realizado pelo grupo do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, que analisou 181 amostras de sarcomas humanos.⁵⁴ Em razão da importância da casuística, em se tratando de doença rara, os autores disponibilizaram o banco de dados para pesquisa pública, acessível no site <http://watson.nhgri.nih.gov/sarcoma>. Trata-se de uma amostra heterogênea, ao incluir, além de tumores de partes moles, tumores ósseos, tumores viscerais e dermatofibrossarcomas protuberans. Portanto, não permite qualquer correlação clínica entre os achados moleculares. A análise dos resultados desse estudo diferenciou geneticamente alguns subtipos histológicos. Entre os fibrohistiocitomas malignos, atualmente classificados como sarcomas pleomórficos, chamou atenção a elevada expressão do gene PLAU, que codifica o receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase. Esse gene foi o segundo em número de vezes de expressão diferencial identificado em nossa análise entre os tumores considerados resistentes à quimioterapia.

A reativação de vias específicas de desenvolvimento embrionário é apontada por Wunder et al, em uma revisão recente, como importante fator envolvido no desenvolvimento de sarcomas e como possível alvo de abordagens terapêuticas⁹⁶. O estudo de Baird et al⁵⁴ também descreve genes envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial como significativamente expressos em vários subtipos de sarcomas. Nenhum dos genes pertencentes a essa categoria identificados trabalho de

Baird et al ⁵⁴ aparece em nossa análise. Porém, os dois genes com maior expressão diferencial em número de vezes em nosso estudo, respectivamente no grupo de não respondedores e respondedores, são genes do desenvolvimento embrionário (Dell e Hes1). No grupo de tumores respondedores, quatro entre os dez genes mais expressos são genes envolvidos com desenvolvimento (Hes1, AF4, EDN3 e SOX8).

Analisamos detalhadamente os genes descritos como diferentemente expressos nos quatro trabalhos que se propuseram a avaliar o perfil de expressão gênica em sarcomas como fator prognóstico. ⁵⁶⁻⁵⁹. Apesar de não ter sido esse o objetivo do nosso estudo, não encontramos nenhum dos genes identificados em nossa análise nas listas de genes descritos nos referidos trabalhos como associados a maior potencial metastático. Aliás, também não há sobreposição de genes entre as listas de seqüências identificadas nos quatro trabalhos.

Até o último levantamento bibliográfico por nós realizado, não havia nenhum trabalho cujo objetivo fosse determinar fatores preditivos de resposta à quimioterapia em sarcomas de partes moles de adultos, a partir do perfil de expressão gênica. Três trabalhos realizaram esse tipo de análise em osteossarcoma ⁶⁰⁻⁶² Um desses trabalhos analisou a expressão gênica de 30 osteossarcomas e a expressão significativamente aumentada de TGF β foi identificada no grupo de mau respondedores. ⁶¹

Diante da escassez de estudos que se proponham a identificar fatores preditivos de resposta à quimioterapia em sarcomas de partes moles através de análise do perfil de expressão gênica, procuramos trabalhos com o mesmo objetivo, mas em câncer de mama, onde a doxorrubicina é uma das principais drogas utilizadas. Em nosso meio, o estudo conduzido por Folgueira et al ⁸⁰ utilizaram uma plataforma muito semelhante a nossa, também construída pelo grupo do Instituto Ludwig / Hospital

A.C. Camargo, e analisaram 44 amostras de carcinomas de mama. Um trio de genes (PRS11, MTSS1 e CLPTM1) foi capaz de distinguir 95,4% das amostras entre respondedores e não respondedores à quimioterapia baseada em doxorrubicina. Os demais genes diferentemente expressos nesse estudo também não apresentaram similaridade com os do nosso estudo. O mesmo ocorreu quando comparamos nossos resultados com o estudo conduzido por Ayers et al ⁹⁷, que analisou o perfil de expressão gênica de 42 pacientes com câncer de mama submetidas a quimioterapia com paclitaxel, fluorouracil, doxorrubicina e ciclofosfamida, utilizando uma plataforma de cDNA com 30.721 seqüências. Um outro estudo conduzido em uma instituição alemã analisou o perfil de expressão gênica de 100 amostras de carcinomas de mama de pacientes tratadas com a combinação gencitabina, epirrubicina e docetaxel. A plataforma utilizada foi uma lâmina de oligonucleotídeos com 21.329 seqüências. Os autores identificaram uma assinatura genética de 512 genes com acurácia de 88 % para prever resposta patológica completa. A via mais representada entre os 512 genes foi a via de sinalização regulada por TGF β . ⁹⁸

Há alguns anos, na fase de delineamento do projeto, optamos por envolver todos os subtipos histológicos de sarcomas de partes moles de adultos, excluindo-se apenas os subtipos associados à faixa etária pediátrica e os subtipos de origem osteocartilaginosa. A seleção seria primordialmente pelo grau histológico, quando excluimos os tumores de baixo grau. A opção por incluir múltiplos tipos histológicos foi basicamente por dois motivos: 1) atingir mais rapidamente um número de casos representativo; 2) queríamos realmente encontrar um marcador molecular de predição de resposta que fosse independente dos mais de 50 subtipos histológicos descritos em sarcomas de partes moles. Naquela época, acreditávamos que o subtipo

histológico não influenciava de forma significativa o prognóstico e a resposta ao tratamento, principalmente diante da dificuldade de classificação e da variação interobservador, onde o mesmo tumor poderia ser classificado de formas diferentes quando estudado por patologistas diferentes. Atualmente, as recentes publicações sobre análise do perfil de expressão gênica têm ratificado a importância da classificação dos subtipos histológicos, mostrando que alguns tumores são realmente diferentes não só do ponto de vista morfológico e imunoistoquímico, mas principalmente molecular. Wunder et al ⁹⁶, em uma recente revisão, propõem uma divisão para os sarcomas em dois grandes grupos: aqueles com eventos moleculares diagnósticos estabelecidos, onde se incluem os tumores estromais gastrointestinais (GIST's), os tumores neuroectodérmicos primitivos e os sarcomas sinoviais, e aqueles com alterações genéticas e histológicas mais complexas e variáveis, como os sarcomas pleomórficos e os leiomiossarcomas. Ao reavaliar nossos critérios de seleção, continuaríamos a incluir todos os subtipos histológicos em razão da raridade da doença e da dificuldade de recrutamento de casos, mas pretendemos, com uma casuística bem maior, analisar separadamente o perfil de expressão gênica de sarcomas sinoviais, sarcomas pleomórficos e leiomiossarcomas, todos tratados da mesma forma. Acreditamos que, no futuro, a partir de informações moleculares, passemos a tratar esses tumores de forma mais individualizada e orientada por fatores preditivos mais acurados.

Com exceção dos GIST's e, mais recentemente, dos dermatofibrossarcomas protuberans, ensaios clínicos com terapias alvo-direcionadas têm falhado em demonstrar eficácia no tratamento de outros grupos de sarcomas. ⁹⁶ Talvez a inibição de um único receptor de fator de crescimento ou de um único receptor tirosina-

quinase não seja suficiente para bloquear ou facilitar uma via de sinalização defeituosa. Nossos dados apontaram para um defeito na via de sinalização regulada por TGF β que diferenciou tumores respondedores de não respondedores ao esquema neoadjuvante empregado. Um inibidor seletivo da atividade quinase do receptor tipo 1 de TGF β já vem sendo testado com sucesso em experimentos animais.⁹⁹ Porém, ao analisarmos quais genes pertencentes a essa via se encontravam diferentemente expressos, observamos que paradoxalmente tanto o próprio ligante TGF β 1, como alguns de seus inibidores (FST e LTBP1) se encontravam superexpressos entre os tumores resistentes à quimioterapia. Outros genes superexpressos nesse grupo também participam indiretamente da regulação da via. Portanto, apesar de termos identificado uma via defeituosa, não fomos capazes de determinar quais genes mais influenciam na alteração. Mais importante ainda é o fato de não sabermos, a partir da metodologia empregada, para que direção funcional a via está alterada. Portanto, caso esses dados sejam de fato validados com o aumento da casuística, estudos subseqüentes devem ser desenvolvidos no sentido de verificar exatamente em que nível funcional se encontra a alteração da via, para finalmente podermos propor terapias direcionadas.

Uma outra característica genética dos tumores resistentes à quimioterapia em nossa análise foi a presença de vários genes superepressos com potencial angiogênico. O papel da angiogênese na progressão tumoral e no desenvolvimento de metástases é bem conhecido, assim como a eficácia de seu bloqueio no tratamento de muitos tumores.^{100,101} Porém, gostaríamos de chamar atenção para outro aspecto que parece ter relevância especial em sarcomas: a alta pressão do fluido intersticial no interior dos tumores, que dificulta a penetração de quimioterápicos. Alguns

grupos de pesquisa da Suécia, que incluem o braço sueco do Instituto Ludwig e o Instituto Karolinska, têm desenvolvido linhas de investigação específicas em pressão do fluido intersticial de tumores sólidos. Uma revisão publicada por autores dessas instituições, entre outros,¹⁰² demonstra que tanto a formação de novos vasos anômalos como a formação de matriz extracelular induzida por TGF β aumenta a pressão do fluido intersticial no microambiente tumoral. Nesse sentido, o emprego de anti-angiogênicos ou inibidores de atividade de TGF β em combinação com quimioterápicos convencionais com objetivo de diminuir a pressão intersticial e facilitar a penetração desses quimioterápicos parece ser uma estratégia interessante a ser testada em ensaios clínicos futuros.

O presente estudo também se propôs a avaliar os resultados preliminares de um ensaio clínico fase II não controlado que testa um esquema de tratamento neoadjuvante com doxorrubicina e ifosfamida, sem radioterapia na fase pré-operatória.

Os dados preliminares desse ensaio clínico nos mostram uma taxa de resposta objetiva à quimioterapia neoadjuvante de 28,6%, quando utilizamos um critério padronizado de avaliação de resposta. Até o momento, a taxa de amputação foi de 7,1% (1/14) e apenas um paciente deixou de ser operado por progressão de doença durante a fase pré-operatória. Nenhum paciente morreu por toxicidade do tratamento. A taxa de complicação de ferida operatória foi de 23% e essas complicações não interferiram no plano terapêutico pós-operatório.

A comparação desses resultados com os dados retrospectivos de nossa série histórica de pacientes submetidos a radioquimioterapia é muito questionável, basicamente em função da diferença de tamanho entre as amostras, da diferença na

coleta de dados (um retrospectivo e outro prospectivo) e por não termos o mesmo critério de avaliação de resposta nas duas coortes.

Apenas em caráter ilustrativo, podemos lembrar que em um pequeno subgrupo de 10 pacientes da série histórica em que obtivemos informação precisa sobre as medidas pré e pós radioquimioterapia, a taxa de resposta parcial foi de 10% e a taxa de progressão durante o tratamento foi de 20%. Se levarmos em consideração critérios essencialmente clínicos e subjetivos, baseados em dados de anamnese e exame físico, a taxa de benefício clínico com o esquema de tratamento em análise foi de 71,4%, contra 32% em nossa série histórica, devendo-se considerar a significativa perda de informação em coletas de dados retrospectivas, particularmente em dados mais subjetivos.

Com relação à taxa de amputação, também não podemos inferir que o esquema atual seja capaz de proporcionar maiores taxas de preservação de membros, comparativamente à nossa experiência prévia com radioquimioterapia, onde tivemos 14,3% de amputações. Primeiro em razão do reduzido tamanho da amostra. Além disso, a proporção de pacientes com doença metastática é maior no presente estudo, o que pode se constituir em um viés a favor da preservação de membros. Sabemos que a presença de metástases desencoraja amputações e estimula cirurgiões a insistirem em cirurgias conservadoras em função da perspectiva de sobrevida curta. Por outro lado, podemos já afirmar que o esquema proposto é seguro no sentido de não aumentar nossas taxas de amputação.

Outro parâmetro que nos causava preocupação era o risco de aumento em nossa taxa de suspensão de cirurgia decorrente de complicações do tratamento ou de progressão de doença na vigência de um esquema bem mais longo de tratamento

neoadjuvante. Em nossa série histórica de 49 pacientes, três deixaram de ser operados por progressão de doença durante a radioquimioterapia (6,1%). No esquema de tratamento em investigação, até o momento, esse evento ocorreu em um caso entre os 14 tratados (7,1%), o que nos leva também a confiar na segurança do esquema.

Talvez o resultado que mais chame a atenção nesse estudo são a frequência e o padrão de complicações pós-operatórias relacionadas à ferida operatória. O pequeno tamanho da casuística não nos permite demonstrar diferença estatística nas taxas de complicação de ferida entre as duas modalidades de tratamento pré-operatório (23% com quimioterapia exclusiva *versus* 41,8% com radioquimioterapia), mas é a análise qualitativa desses resultados que os torna mais interessantes. Entre os 14 pacientes tratados, ocorreram duas deiscências parciais e superficiais de ferida secundárias a infecção local e um sangramento pós-operatório que levou a uma reoperação no primeiro dia pós-operatório. Essas deiscências se resolveram em poucas semanas com cuidados locais e uso de antibióticos em tempo hábil para não alterar o planejamento e a realização de radioterapia pós-operatória, prevista no protocolo. Por outro lado, as complicações em ferida observadas entre nossos pacientes submetidos a radioquimioterapia pré-operatória se caracterizaram por extensas deiscências, associadas a necrose de retalhos, com necessidade de várias intervenções para debridamento de tecidos desvitalizados. As conseqüências dessas complicações se refletiram em significativa modificação do plano terapêutico em 14 de 19 pacientes (74%) que teriam indicação de quimioterapia adjuvante, de acordo com o protocolo da época, e que deixaram de recebê-la em decorrência das complicações. Alguns trabalhos têm relatado melhora nas taxas de complicações em ferida operatória com

emprego de técnicas mais complexas de reconstrução, como o uso de retalhos microcirúrgicos.^{103,104} Em nenhum dos casos do ensaio clínico em discussão foi necessário o emprego de reconstrução microcirúrgica. Mas em nossa experiência institucional, a abordagem conjunta da equipe de Cirurgia Oncológica com a equipe de Microcirurgia Reconstructora em casos de maior complexidade para reconstrução tem obtido resultados muito bons, senão extraordinários. Vale ressaltar a maior complexidade e potencial morbidade associada à reconstrução microcirúrgica e não acreditamos que essa deva ser uma solução sistemática para resolução do problema das complicações em ferida operatória em sarcomas de extremidade, restringindo-se sua indicação para casos selecionados.

Em comparação aos resultados publicados na literatura, a taxa de resposta objetiva obtida até o momento no presente estudo estão compatíveis com as relatadas pela maioria dos trabalhos que analisaram radioquimioterapia pré-operatória, as quais oscilam entre 26% e 30%^{12,24,25}.

Até o momento, encontramos apenas dois estudos clínicos publicados que se propuseram a testar quimioterapia exclusiva com finalidade pré-operatória em sarcomas de partes moles de extremidades em adultos. O primeiro estudo, publicado em 2001, utilizou 50 mg/m² de adriamicina e 5 g/m² de ifosfamida por ciclo, até completar três ciclos. Os autores relataram taxa de resposta clínico-radiológica de 29%, com 8% de toxicidade hematológica severa e um óbito e ressaltaram que a quimioterapia pré-operatória não comprometeu a realização de cirurgia e radioterapia.³¹ Bem mais recentemente, logo após o término do recrutamento de pacientes para o nosso estudo, um outro trabalho foi publicado descrevendo os resultados de um ensaio clínico multicêntrico suíço, que utilizou 90 mg/m² de

adriamicina e 10 mg/m² de ifosfamida por ciclo, chegando até seis ciclos. Com essas doses elevadas, os autores obtiveram 48% de resposta objetiva. A taxa de complicações graus 3 e 4 foi de 59% e apenas 43% dos pacientes foram operados.¹⁰⁵

A intensificação da dose parece de fato estar associada a maiores taxas de resposta, mas também a aumento de toxicidade. Como as taxas de resposta relatadas na literatura e em nossa experiência institucional já proporcionam bom controle local da doença, com altas taxas de preservação de membros, a intensificação da dose e conseqüente aumento de toxicidade só se justifica caso se traduza em ganho de sobrevida em longo prazo, o que até agora não foi demonstrado.

Em nosso estudo, três pacientes apresentaram porcentagem de células viáveis menor que 5% após o tratamento neoadjuvante com quimioterapia exclusiva, sendo uma resposta patológica completa. Com relação ao outro caso que apresentou 0% de células viáveis (resposta patológica completa), não pudemos classificá-lo em nossa análise como respondedor porque houve migração para um esquema com radioterapia antes da cirurgia, após ausência de resposta clínica com quimioterapia exclusiva, não sendo possível determinar se a resposta patológica foi decorrente da quimioterapia, da radioterapia ou de ambas.

Optamos por adotar a porcentagem de células viáveis como parâmetro de resposta patológica, ao invés da porcentagem de necrose. Fizemos essa opção basicamente porque os sarcomas de alto grau já exibem espontaneamente altos índices de necrose, a despeito de tratamento. Consideramos que, diante de uma alta porcentagem de necrose em um espécime cirúrgico de sarcoma de alto grau, submetido a algum tratamento pré-operatório, não seria possível distinguir se a necrose seria atribuída ao próprio comportamento biológico do tumor ou secundária

ao efeito de tratamento citotóxico. Apesar dessas considerações, um estudo retrospectivo norte-americano demonstrou que pacientes portadores de sarcomas de alto grau, submetidos a tratamento neoadjuvante, cujos tumores ressecados exibiam índices de necrose maiores ou igual a 95% tinham taxas de recidiva local e sobrevida global significativamente melhores.¹⁰⁶ Por outro lado, um outro trabalho analisou retrospectivamente o valor da porcentagem de necrose em 82 pacientes submetidos a quimioterapia neoadjuvante. Nesse estudo, não houve diferença significativa em sobrevida livre de recidiva ou sobrevida global em relação à porcentagem de necrose na peça operatória menor ou maior que 95%.¹⁰⁷ O aumento da nossa casuística e o seguimento em longo prazo nos permitirão avaliar o valor prognóstico das duas variáveis, tanto a porcentagem de células viáveis, como a porcentagem de necrose nas peças, variável que também vem sendo coletada.

Elegemos como critério de resposta no desenho do estudo os critérios padronizados pelo grupo chamado RECIST.²⁷ Trata-se de um método unidimensional e de simples execução e interpretação. Mas apesar de ser o critério mais utilizado nos ensaios clínicos atualmente para mensurar resposta a tratamento em tumores sólidos, identificamos alguns problemas em sua aplicação. Em alguns casos em que não houve regressão maior que 30% no maior diâmetro do tumor, observamos melhora clínica significativa, traduzida tanto pelo relato de melhora sintomática pelo paciente quanto, principalmente, por mudança das características à palpação, como a melhora da mobilidade em relação aos planos profundos e a consistência do tumor, que passou a se tornar mais cístico. Reconhecemos que esses parâmetros clínicos são difíceis de serem traduzidos em uma informação objetiva que permita comparação adequada de resultados entre diferentes estudos, mas talvez

devessem ser considerados na avaliação. Observamos também que não houve correlação exata entre a manutenção do tamanho do tumor ao exame de imagem e a porcentagem de células viáveis na peça operatória, sendo ilustrativo o caso em que não houve regressão do tumor após quimioterapia ou radioterapia e a peça não exibiu neoplasia viável. Enfatizamos que os quatro casos identificados como respondedores em nosso estudo apresentaram resposta objetiva tanto clínica quanto radiológica. Em três deles, a porcentagem de células viáveis na peça foi menor que 20%. Porém, um dos casos classificado como respondedor pelo RECIST teve 50% de neoplasia viável no espécime cirúrgico e, apesar de significativa regressão no tamanho do tumor, não foi possível a preservação do membro (mão). Tememos também ter classificado inapropriadamente alguns casos como não respondedores, baseados apenas nos critérios radiológicos, mas com claro benefício clínico, embora subjetivo. Talvez o padrão de crescimento dos sarcomas, caracterizados por um crescimento expansivo e formação de uma pseudocápsula, diferentemente dos carcinomas, que possuem um padrão infiltrativo de crescimento, prejudique a avaliação da resposta através da simples mensuração do maior diâmetro do tumor. Em sarcomas, talvez a diminuição de neoplasia viável secundária ao tratamento não se traduza imediatamente em redução de dimensões, mas em substituição por necrose, fibrose ou hemorragia. Essas mesmas considerações foram recentemente citadas em uma publicação que concluiu que o RECIST foi inadequado para avaliar resposta de GIST's tratados com imatinib.¹⁰⁸ Outro autor, em um editorial também de 2007, faz severas críticas ao RECIST, mas conclui o critério deve permanecer válido ainda por alguns anos, em razão de sua fácil aplicabilidade em qualquer centro e do baixo custo.¹⁰⁹ O advento de métodos metabólicos e quantitativos de avaliação de atividade tumoral,

como a tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT), pode proporcionar, em futuro próximo e após validação em estudos prospectivos, critérios mais fidedignos de avaliação de resposta.

Resumidamente, os dados provenientes da análise do perfil de expressão gênica dos sarcomas estudados, assim como os resultados preliminares do estudo clínico que investiga a efetividade da quimioterapia pré-operatória, nos levaram muito mais a novos questionamentos do que nos proporcionaram soluções imediatas para problemas antigos.

Os dados preliminares do estudo clínico, ao demonstrarem taxa de resposta semelhante aos historicamente obtidos com radioquimioterapia e com menores taxas de complicações, nos estimulam a prosseguir para um estudo de fase III, multi-institucional. Esses questionamentos, quanto à melhor modalidade (radioterapia, quimioterapia ou combinação) e o momento (adjuvante ou neoadjuvante) do tratamento complementar à cirurgia ainda permanecem sem resposta definida nas revisões mais recentes, disponíveis na literatura.^{6,15,16}

A análise do perfil de expressão gênica aponta para uma correlação dos genes ligados ao desenvolvimento, à angiogênese, à degradação de matriz extracelular e, particularmente, à regulação da via de TGF β com resposta ou resistência à combinação doxorrubicina e ifosfamida. A validação desses resultados em uma casuística maior e a melhor compreensão desses processos biológicos pode sugerir a adição de novas drogas, direcionadas a alvos específicos, ao esquema atualmente utilizado.

7- CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo, podemos concluir o exposto abaixo.

- 1) Tumores que responderam à quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ifosfamida apresentaram perfil de expressão gênica diferente dos tumores considerados não respondedores.
- 2) Foram identificados 196 genes diferentemente expressos entre amostras de tumores respondedores e não respondedores à quimioterapia.
- 3) Entre os genes com diferença mais significativa de expressão, identificamos genes envolvidos nas vias de sinalização regulada por TGF β , genes envolvidos com regulação de angiogênese, genes envolvidos com degradação de matriz extracelular e genes ligados ao desenvolvimento.
- 4) A via de sinalização regulada por TGF β foi identificada como significativamente alterada na comparação entre os tumores respondedores à quimioterapia com os não respondedores.
- 5) A taxa de resposta objetiva obtida com quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ifosfamida em sarcomas de partes moles de alto grau e avançados de extremidades de adultos foi 28,6%.
- 6) A taxa de complicações relacionadas à ferida operatória foi de 23% e o padrão das complicações não determinou atraso ou alteração do plano terapêutico pós-operatório.

- 7) O esquema terapêutico investigado foi considerado seguro no sentido de não ter aumentado as taxas de amputações e de suspensão de cirurgia por toxicidade ou progressão de doença.

8 - ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento para o Ensaio Clínico

Hospital do Câncer – Fundação Antônio Prudente

R. Professor Antônio Prudente, 211 – telefone: 3272-5000

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução n. 196/96 e resolução CNS 252/97 do Ministério da Saúde)

Este termo de consentimento está sendo solicitado exclusivamente para participação nesta pesquisa, sem possibilidade de extensão da mesma autorização para outros projetos.

PROJETO: Estudo Prospectivo Consecutivo para Quimioterapia Neoadjuvante com Doxorrubicina e Ifosfamida em Sarcomas de Partes Moles de Alto Grau de Extermidades

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE:

Sexo: () masculino () feminino Data de nascimento: ____/____/____
Documento de identidade n: _____
Endereço: _____

Número: _____ Complemento _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Tel: _____

RESPONSÁVEL: _____

Sexo: () masculino () feminino Data de nascimento: ____/____/____
Documento de identidade n: _____
Endereço: _____

Número: _____ Complemento _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Tel: _____

II. OBJETIVOS DO ESTUDO

O tratamento dos sarcomas de partes moles de alto grau localizados em extremidades atualmente é baseado na radioterapia, concomitante ou não à quimioterapia, seguida de cirurgia para retirada do tumor. O tratamento pré-operatório (neoadjuvante) tem por objetivo diminuir o tamanho do tumor, possibilitando a preservação do membro, e diminuir as chances de recidiva no local. As taxas de complicações relacionadas à ferida operatória têm sido elevadas e podem estar associadas ao emprego da radioterapia antes da cirurgia. Essas complicações atrasam ou até impedem a realização de quimioterapia após a cirurgia (adjuvante), a qual tem por objetivo a erradicação de células cancerosas que não são detectáveis aos exames habituais (micrometástases) e podem vir a se desenvolver em outros órgãos, no futuro. A realização exclusivamente de quimioterapia antes da cirurgia (neoadjuvante) teria as vantagens potenciais (teóricas) de iniciar precocemente o tratamento das micrometástases e diminuir as taxas de complicações de cicatrização atribuídas à radioterapia.

O objetivo desse estudo é avaliar um esquema investigacional de tratamento pré-operatório que envolve apenas quimioterapia, postergando a radioterapia para depois da cirurgia, após a cicatrização adequada da ferida. O objetivo primário é determinar as taxas de resposta (redução do tamanho do tumor) do esquema proposto, assim como suas taxas de complicações.

O estudo prevê também a coleta de material (fragmento de tumor) para análise genética, antes do início do tratamento.

III. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS E DURAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Você poderá participar de um estudo experimental no Hospital do Câncer que inclui pacientes com suspeita de sarcoma de partes moles localizado em extremidades, com mais de 18 anos de idade e que não tenham sido submetidos previamente a radioterapia ou a quimioterapia. Você será submetido a uma biópsia para determinação do diagnóstico e poderá ser incluído no estudo se o resultado for sarcoma de alto grau. Caso aceite participar do estudo, uma parte do material obtido na biópsia será armazenada para análise genética do tumor.

Após a biópsia, realizará exames de sangue, além de tomografia computadorizada do tórax e tomografia ou ressonância magnética do local do tumor.

Após avaliação dos resultados dos exames, será iniciada a quimioterapia pré-operatória endovenosa, que será baseada no uso concomitante de duas drogas, a doxorrubicina e a ifosfamida. Serão realizados quatro (4) ciclos que duram cinco (5) dias cada um, com intervalo de 21 dias entre eles.

Após o término da quimioterapia, você realizará novamente uma tomografia do tórax e uma tomografia ou ressonância magnética do local do tumor, com objetivo de avaliar o resultado da quimioterapia. A cirurgia para retirada do tumor será então realizada.

A radioterapia externa será iniciada logo que a ferida operatória tenha cicatrizado.

Após término da radioterapia, estão previstos mais quatro ciclos de quimioterapia, semelhantes aos realizados antes da cirurgia, utilizando-se as mesmas drogas. Portanto, o tratamento prevê três meses de quimioterapia, dois meses para cirurgia e radioterapia e mais quatro meses de quimioterapia, completando nove meses de tratamento, aproximadamente.

IV. RISCOS POTENCIAIS

Os riscos potenciais estão relacionados aos efeitos colaterais das drogas utilizadas para quimioterapia.

Doxorrubicina: mielossupressão, que pode resultar em infecções e hemorragias; alterações cardíacas agudas ou crônicas (pericardite ou miocardiopatia); náuseas; vômitos; mucosite; alopecia (queda de cabelo); disfunção sexual e reprodutiva.

Ifosfamida: alterações urinárias, como cistite, hematúria (sangramento na urina) e alterações na função dos rins; mielossupressão, que pode resultar em infecções e hemorragias; náuseas; vômitos; mucosite; alterações da função hepática; alopecia (queda de cabelo); disfunção sexual e reprodutiva

Mesna: náuseas ou vômitos.

V. BENEFÍCIOS PREVISTOS

Caso concorde em participar deste estudo, pode haver ou não benefício médico direto para você. Esperamos que o esquema proposto atinja resultados semelhantes aos esquemas que incluem radioterapia antes da cirurgia, mas sem as complicações relacionadas à ferida atribuídas à irradiação, permitindo reabilitação mais precoce e a continuidade do tratamento pós-operatório. Estes resultados não lhe podem ser garantidos.

VI. TRATAMENTOS ALTERNATIVOS AO OBJETO DA PESQUISA

O esquema de tratamento adotado classicamente em nosso hospital para sarcomas de alto grau de extremidades envolve radioterapia concomitante a quimioterapia com doxorrubicina, seguida de cirurgia.

VII. SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE

Você terá segurança de que seus dados obtidos nos questionários da pesquisa só serão de conhecimento dos médicos responsáveis pelo estudo, a menos que requeridos judicialmente. Você, seus familiares ou acompanhante responsável autorizado poderão ter acesso aos seus dados quando solicitados. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas médicas, apresentados em congressos ou eventos científicos, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

VIII. ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Você não terá nenhum tipo de remuneração ao aceitar este tratamento. A pesquisa não envolve nenhuma forma de compensação financeira aos participantes. O Hospital do Câncer A.C. Camargo, assim como os médicos responsáveis pela pesquisa, não se isentarão da responsabilidade legal sobre os eventuais malefícios

que possam acometer o paciente, desde que os mesmos advenham da intervenção realizada no estudo.

Não existe nenhum tipo de indenização para complicações ou seqüelas causadas pelo tratamento.

IX. ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA

A participação no estudo é voluntária. Você tem o direito de sair do estudo a qualquer momento e por qualquer motivo.

Caso venha a abandonar o estudo ou decidir não participar do mesmo, o seu tratamento não será prejudicado. No entanto, se você decidir sair da pesquisa, deverá informar seu médico.

X. INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS.

Em qualquer dúvida sobre o estudo você poderá entrar em contato com:

Dr. Samuel Aguiar Junior

Hospital do Câncer – Tel: 3272-5000. Ramais: 2303 ou 2304.

XI. CONSENTIMENTO LIVRE E PÓS-INFORMADO

Eu declaro que li e compreendi a proposta de tratamento e fui convenientemente esclarecido pessoalmente pelo pesquisador. Declaro que entendo os riscos da minha doença, o objetivo do estudo e os riscos e benefícios do tratamento. Declaro que, de forma voluntária, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Declaro também que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto na utilização dos fragmentos do tumor coletados para a criação de um banco de tumores e, posteriormente, a determinação de fatores moleculares relacionados com resposta clínica e patológica ao tratamento quimioterápico ou fatores relacionados ao prognóstico.

São Paulo, ____/____/____.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Eu declaro que expliquei este protocolo de tratamento, com todos os detalhes necessários para o paciente (ou seu responsável legal)

_____.

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Anexo B – Termo de Consentimento para o estudo genético**Hospital do Câncer – Fundação Antônio Prudente**

R. Professor Antônio Prudente, 211 – telefone: 3272-5000

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução n. 196/96 e resolução CNS 252/97 do Ministério da Saúde)

Este termo de consentimento está sendo solicitado exclusivamente para participação nesta pesquisa, sem possibilidade de extensão da mesma autorização para outros projetos.

PROJETO: Identificação de genes diferencialmente expressos em sarcomas de partes moles de extremidades como fatores preditivos de resposta a quimioterapia neoadjuvante com doxorrubicina e ifosfamida

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE: _____

Sexo: () masculino () feminino Data de nascimento: ____/____/____

Documento de identidade n: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Tel: _____

RESPONSÁVEL: _____

Sexo: () masculino () feminino Data de nascimento: ____/____/____

Documento de identidade n: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Tel: _____

II. OBJETIVOS DO ESTUDO

Você foi convidado anteriormente a participar de um estudo experimental que testa um esquema de tratamento pré-operatório em sarcomas de partes moles de alto grau histológico em extremidades que envolve apenas quimioterapia, postergando a radioterapia para depois da cirurgia, após a cicatrização adequada da ferida. O objetivo primário é determinar as taxas de resposta (redução do tamanho do tumor) do esquema proposto, assim como suas taxas de complicações.

O grau de malignidade histológica é atualmente o único fator capaz de predizer, com acurácia ainda razoável, a eficácia do tratamento pré-operatório, ou seja, as taxas de resposta. É possível que algumas características genéticas armazenadas no tumor possam também ter essa capacidade e, talvez, com maior precisão. Até o momento, não se conhecem estudos publicados em sarcomas de partes moles que respondam adequadamente a esse questionamento.

O objetivo do estudo que agora propomos é tentar identificar um ou um grupo de genes presentes nos tumores que possam predizer as taxas de resposta da quimioterapia realizada antes da cirurgia, através da análise genética de um fragmento do tumor.

III. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Você poderá participar de um estudo no Hospital do Câncer que inclui pacientes com suspeita de sarcoma de partes moles localizado em extremidades, com mais de 18 anos de idade e que não tenham sido submetidos previamente a radioterapia ou a quimioterapia. Você será submetido a uma biópsia para determinação do diagnóstico e poderá ser incluído no estudo se o resultado for sarcoma de alto grau. Caso aceite participar do estudo, uma parte do material obtido na biópsia será armazenada para análise genética do tumor.

Nessa análise, cuja técnica se chama *microarray*, cerca de 4800 genes ou seqüências de genes são analisados conjuntamente.

Os resultados serão então correlacionados com as taxas de resposta à quimioterapia pré-operatória (redução do tamanho do tumor) na tentativa de identificar um ou um grupo de genes que estejam associados a melhores ou piores resultados.

O material coletado será armazenado, havendo a possibilidade de utilizá-lo em pesquisas futuras. Nesse caso, você será novamente contatado para conceder ou não autorização para utilização do material em nova pesquisa.

IV. RISCOS POTENCIAIS

Os riscos potenciais estão relacionados às possíveis complicações das biópsias, como infecção ou hematomas.

V. BENEFÍCIOS PREVISTOS

Não há benefício direto previsto para os participantes desse estudo. Esperamos que, ao identificar fatores genéticos com alta capacidade de predizer resposta ao

tratamento, outras populações possam vir a se beneficiar, no futuro, de critérios mais acurados de indicação do tratamento.

VI. SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE

Você terá segurança de que seus dados obtidos só serão de conhecimento dos pesquisadores responsáveis pelo estudo, não sendo permitido acesso a terceiros, a menos que requeridos judicialmente. Você, seus familiares ou acompanhante responsável autorizado poderão ter acesso aos seus dados quando solicitados. Os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas médicas, apresentados em congressos ou eventos científicos, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

VII. ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Você não terá nenhum tipo de remuneração ao aceitar participar desse estudo. A pesquisa não envolve nenhuma forma de compensação financeira aos participantes. Como a pesquisa envolve análise de alterações genéticas apenas no tumor e não de características genéticas herdadas pelo indivíduo, não estão previstos programas de aconselhamento genético.

VIII. ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA

A participação no estudo é voluntária. Você tem o direito de sair do estudo a qualquer momento e por qualquer motivo.

Caso venha a abandonar o estudo ou decidir não participar do mesmo, o seu tratamento não será prejudicado. No entanto, se você decidir sair da pesquisa, deverá informar seu médico.

IX. INFORMAÇÕES SOBRE NOMES, TELEFONES E ENDEREÇOS PARA CONTATOS.

Em qualquer dúvida sobre o estudo você poderá entrar em contato com:

Dr. Samuel Aguiar Junior

Hospital do Câncer – Tel: 3272-5000. Ramais: 2303 ou 2304.

XI. CONSENTIMENTO LIVRE E PÓS-INFORMADO

Eu declaro que li e compreendi a proposta da pesquisa e fui convenientemente esclarecido pessoalmente pelo pesquisador. Declaro que, de forma voluntária, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, ____/____/____.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Eu declaro que expliquei os objetivos e métodos da pesquisa, com todos os detalhes necessários para o paciente (ou seu responsável legal).

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Anexo C
Protocolo – Laudo de Anatomia Patológica
Sarcomas/Partes moles (Biópsia)

Instituição de Origem: _____

Patologista: _____

Paciente: _____ n° AP _____

Idade: _____ Sexo: _____

Localização: _____

Procedimento: (Biópsia por agulha, incisional, guiada por TC, excisional).

Tipo histológico: _____

Grau histológico: _____

Grau de diferenciação: _____

Índice mitótico: _____

Necrose: _____

Biópsia(s) anterior(es):

Imunoistoquímica:

Marcador	Status	Marcador	Status
Vimentina		CD 34	
Actina músc liso		CD 31	
Actina HHF35		Fator VIII	
Mioglobina		CD 99 (p30/32)	
Miogenina		EMA	
Myo D1		CK AE1/AE3	
S100		C-Kit	

Grau de diferenciação	Atividade mitótica	Necrose tumoral	Grau histológico
1: Bem diferenciado (sarcomas lembrando tecido mesenquimal de origem)	1: 0-9 mit/10CGA	0: ausente	Grau 1: escore 2 e 3
2: Sarcomas moderadamente diferenciados	2: 10-19 mit/10CGA	1: ≤50%	Grau 2: escore 4 e 5
3: Sarcomas indiferenciados e embrionários	3: ≥ 20 mit/10CGA	2: ≥50%	Grau 3: escore 6, 7 e 8

Anexo D – Ficha para coleta de dados
Protocolo para sarcomas de partes moles de extremidades de alto grau

Dados pessoais		
1. Número no estudo		
2. RG no hospital		
3. Nome		
4. Procedência	(1) região Norte, área metropolitana (2) região Norte, zona rural (3) região NE, área metropolitana (4) região NE, zona rural (5) região Centro-oeste, área metropolitana (6) região Centro-oeste, zona rural (7) região SE, área metropolitana (8) região SE, zona rural (9) região Sul, área metropolitana (10) região Sul, zona rural	
5. Telefone para contato		
6. Idade à admissão		
7. Sexo	(1) masculino (2) feminino	
8. Raça	(1) pardo (2) negro (3) branco (4) amarelo (5) indígena	
Dados clínicos pré-tratamento		
9. Sintomas e sinais	(0) nenhum (1) tumor (2) dor local (3) limitação funcional (4) dor irradiada (compressão de nervo) (5) déficit motor (neurológico) (9) outros	
10. Topografia da lesão	(1) membro inferior (2) membro superior (3) cintura pélvica (4) cintura escapular	
11. Tamanho do maior diâmetro ao exame físico		
12. Características à palpação	(0) não palpável (1) tumor móvel em relação ao plano ósseo e à pele (2) tumor fixo em relação ao plano ósseo (3) infiltra a pele (4) pulso arterial distal diminuído	
13. Manipulação prévia	(0) nenhuma (1) biópsia incisional (2) biópsia com agulha (3) ressecção recente	

	(5) tumor recidivado (ressecção há mais de três meses)	
14. Índice de Karnofsky		
15. Comorbidades	(0) nenhuma (1) hipertensão arterial (2) diabetes (3) insuficiência cardíaca (4) insuficiência coronariana (5) tabagismo (6) etilismo (7) obesidade (8) insuficiência vascular periférica (9) colagenose (10) outras	
16. Hb		
17. Ht		
18. Leucócitos		
19. Granulócitos		
20. Plaquetas		
21. Uréia		
22. Creatinina		
23. TGO		
24. TGP		
25. Fosfatase alcalina		
26. Bilirrubinas totais		
27. Fração de ejeção		
Dados radiológicos pré-tratamento		
28. Tipo de exame	(1) TC (2) RNM	
29. Tamanho (maior diâmetro)		
30. Relação com estruturas adjacentes	(0) tumor restrito ao compartimento muscular (1) desloca feixe vascular e/ou nervoso (2) envolve/abraça/infiltra um feixe vascular e/ou nervoso (3) adjacente a ou infiltra plano ósseo	
31. Estadiamento T	(1) T1a (2) T2a (3) T1b (4) T2b	
Dados anatomopatológicos pré-tratamento		
Número do exame:		
32. Tipo de biópsia	(1) incisional (2) agulha grossa (“tru cut”)	
33. Tipo histológico		

34. Grau histológico	(1) baixo grau (2) grau intermediário (3) alto grau	
35. Estadiamento agrupado AJCC		
Dados do tratamento de indução (1ª ciclo)		
36. Data de início		
37. Náuseas	(0) nenhuma (1) ingestão razoável (2) ingestão significativamente diminuída (3) sem ingestão oral	
38. Vômitos	(0) ausente (1) 1 episódio em 24 hs (2) 2-5 episódios em 24 hs (3) 6-10 episódios em 24 hs (4) > 10 episódios em 24 hs / necessidade de suporte parenteral	
39. Diarréia	(0) nenhuma (1) aumento 2-3 evacuações/dia em relação ao pré-tratamento (2) aumento de 4-6 evacuações/dia ou evacuações noturnas ou cólicas moderada (3) aumento de 7-9 evacuações/dia ou incontinência ou cólicas severas (4) aumento ≥ 10 evacuações/dia ou diarréia com sangue ou necessidade de suporte parenteral	
40. Estomatite	(0) nenhuma (1) úlceras indolores, eritemas ou inflamação leve (2) eritema, edema ou úlcera dolorosos, mas pode comer (3) eritema, edema ou úlcera dolorosos e não pode comer (4) exige suporte enteral ou parenteral	
41. Bilirrubina	(0) DLN* (1) não marcar (2) $1,5 \times N^{**}$ (3) $1,5 - 3,0 \times N$ (4) $> 3,0 \times N$	
42. TGO	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
43. TGP	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
44. Fosf. Alcalina	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
45. Hb (g/100 ml)	(0) DLN (1) $10,0 - N$ (2) $8,0 - 9,9$ (3) $6,5 - 7,9$ (4) $< 6,5$	
46. Leucócitos	(0) $\geq 4,0$ (1) $3,0 - 3,9$ (2) $2,0 - 2,9$	

(x 1000/mm ³)	(3) 1,0 – 1,9 (4) < 1,0	
47. Granulócitos (x 1000/mm ³)	(0) ≥ 2,0 (1) 1,5 – 1,9 (2) 1,0 – 1,4 (3) 0,5 – 0,9 (4) < 0,5	
48. Plaquetas (x 1000/mm ³)	(0) DLN (1) 75 - N (2) 50 – 74,9 (3) 25 – 49,9 (4) < 25	
49. Hemorragia (clínica)	(0) nenhuma (1) leve, sem transfusão (2) grande; 1-2 unidades de transfusão por episódio (3) grande; 3-4 unidades de transfusão por episódio (4) maciça, > 4 unidades de transfusão por episódio	
50. Toxicidade pulmonar	(0) nenhuma (1) assintomático, com alteração ao teste de função pulmonar (2) dispnéia sob esforço (3) dispnéia sob nível normal de atividade (4) dispnéia em repouso	
51. Toxicidade cutânea	(0) ausente (1) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema assintomáticos (2) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema com prurido ou outros sintomas associados (3) máculas, pápulas ou erupções vesiculares sintomáticas generalizadas (4) dermatite esfoliativa ou ulcerativa	
52. Alopecia	(0) sem queda (1) perda leve (2) queda pronunciada ou total	
53. Infecção	(0) ausente (1) leve (2) moderada (3) grave (4) risco de vida	
54. Creatinina	(0) DLN (1) < 1,5 x N (2) 1,5 – 3,0 x N (3) 3,1 – 6,0 x N (4) > 6,0 x N	
55. Hematúria	(0) negativo (1) somente microscópica (2) macroscópica, sem coágulos (3) com coágulos (4) requer transfusão	
56. Toxicidade cardíaca (função)	(0) ausente (1) assintomático, declínio da FE em repouso em menos de 20% do valor basal (2) assintomático, declínio da FE em repouso em	

	mais de 20% do valor basal (3) ICC leve, responsiva a terapia (4) ICC grave ou refratária	
57. Toxicidade cardíaca (arritmias)	(0) ausente (1) assintomático, transitória ou sem necessidade de terapia (2) recorrente ou persistente, sem necessidade de terapia (3) requer tratamento (4) requer monitorização ou hipotensão ou taquicardia ou fibrilação ventricular	
58. Toxicidade cardíaca (pericárdio)	(0) ausente (1) efusão assintomática, não requer transfusão (2) pericardite (atrato, dor torácica e alterações no ECG) (3) requer drenagem (4) tamponamento cardíaco	
59. Neurotoxicidade (sensorial)	(0) ausente (1) parestesias leves (2) perda sensorial objetiva leve a moderada (3) perda sensorial objetiva grave ou parestesias que interferem com a função	
60. Alívio de sintomas (relacionados ao tumor)	(0) não (1) sim	
61. Tamanho ao exame físico (maior diâmetro)		
2º ciclo Caso este ciclo seja suspenso, vá para o item 140		
62. Data do início		
63. Náuseas	(0) nenhuma (1) ingestão razoável (2) ingestão significativamente diminuída (3) sem ingestão oral	
64. Vômitos	(0) ausente (1) 1 episódio em 24 hs (2) 2-5 episódios em 24 hs (3) 6-10 episódios em 24 hs (4) > 10 episódios em 24 hs / necessidade de suporte parenteral	
65. Diarréia	(0) nenhuma (1) aumento 2-3 evacuações/dia em relação ao pré-tratamento (2) aumento de 4-6 evacuações/dia ou evacuações noturnas ou cólicas moderada (3) aumento de 7-9 evacuações/dia ou	

	incontinência ou cólicas severas (4) aumento ≥ 10 evacuações/dia ou diarreia com sangue ou necessidade de suporte parenteral	
66. Estomatite	(0) nenhuma (1) úlceras indolores, eritemas ou inflamação leve (2) eritema, edema ou úlcera dolorosos, mas pode comer (3) eritema, edema ou úlcera dolorosos e não pode comer (4) exige suporte enteral ou parenteral	
67. Bilirrubina	(0) DLN* (1) não marcar (2) $1,5 \times N^{**}$ (3) $1,5 - 3,0 \times N$ (4) $> 3,0 \times N$	
68. TGO	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
69. TGP	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
70. Fosf. Alcalina	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
71. Hb (g/100 ml)	(0) DLN (1) $10,0 - N$ (2) $8,0 - 9,9$ (3) $6,5 - 7,9$ (4) $< 6,5$	
72. Leucócitos (x 1000/mm³)	(0) $\geq 4,0$ (1) $3,0 - 3,9$ (2) $2,0 - 2,9$ (3) $1,0 - 1,9$ (4) $< 1,0$	
73. Granulócitos (x 1000/mm³)	(0) $\geq 2,0$ (1) $1,5 - 1,9$ (2) $1,0 - 1,4$ (3) $0,5 - 0,9$ (4) $< 0,5$	
74. Plaquetas (x 1000/mm³)	(0) DLN (1) $75 - N$ (2) $50 - 74,9$ (3) $25 - 49,9$ (4) < 25	
75. Hemorragia (clínica)	(0) nenhuma (1) leve, sem transfusão (2) grande; 1-2 unidades de transfusão por episódio (3) grande; 3-4 unidades de transfusão por episódio (4) maciça, > 4 unidades de transfusão por episódio	
76. Toxicidade pulmonar	(0) nenhuma (1) assintomático, com alteração ao exame físico (2) dispnéia sob esforço (3) dispnéia sob nível normal de atividade (4) dispnéia em repouso	
77. Toxicidade cutânea	(0) ausente (1) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema assintomáticos (2) mácula dispersa ou	

	erupção papular ou eritema com prurido ou outros sintomas associados (3) máculas, pápulas ou erupções vesiculares sintomáticas generalizadas (4) dermatite esfoliativa ou ulcerativa	
78. Alopecia	(0) sem queda (1) perda leve (2) queda pronunciada ou total	
79. Infecção	(0) ausente (1) leve (2) moderada (3) grave (4) risco de vida	
80. Creatinina	(0) DLN (1) $< 1,5 \times N$ (2) $1,5 - 3,0 \times N$ (3) $3,1 - 6,0 \times N$ (4) $> 6,0 \times N$	
81. Hematúria	(0) negativo (1) somente microscópica (2) macroscópica, sem coágulos (3) com coágulos (4) requer transfusão	
82. Toxicidade cardíaca (função)	(0) ausente (1) assintomático, declínio da FE em repouso em menos de 20% do valor basal (2) assintomático, declínio da FE em repouso em mais de 20% do valor basal (3) ICC leve, responsiva a terapia (4) ICC grave ou refratária	
83. Toxicidade cardíaca (arritmias)	(0) ausente (1) assintomático, transitória ou sem necessidade de terapia (2) recorrente ou persistente, sem necessidade de terapia (3) requer tratamento (4) requer monitorização ou hipotensão ou taquicardia ou fibrilação ventricular	
84. Toxicidade cardíaca (pericárdio)	(0) ausente (1) efusão assintomática, não requer transfusão (2) pericardite (atrato, dor torácica e alterações no ECG) (3) requer drenagem (4) tamponamento cardíaco	
85. Neurotoxicidade (sensorial)	(0) ausente (1) parestesias leves (2) perda sensorial objetiva leve a moderada (3) perda sensorial objetiva grave ou parestesias que interferem com a função	
86. Alívio de sintomas (relacionados ao tumor)	(0) não (1) sim	
87. Tamanho ao exame		

físico (maior diâmetro)		
3º ciclo Caso este ciclo seja suspenso, vá para o item 140		
88. Data de início		
89. Náuseas	(0) nenhuma (1) ingestão razoável (2) ingestão significativamente diminuída (3) sem ingestão oral	
90. Vômitos	(0) ausente (1) 1 episódio em 24 hs (2) 2-5 episódios em 24 hs (3) 6-10 episódios em 24 hs (4) > 10 episódios em 24 hs / necessidade de suporte parenteral	
91. Diarréia	(0) nenhuma (1) aumento 2-3 evacuações/dia em relação ao pré-tratamento (2) aumento de 4-6 evacuações/dia ou evacuações noturnas ou cólicas moderada (3) aumento de 7-9 evacuações/dia ou incontinência ou cólicas severas (4) aumento ≥ 10 evacuações/dia ou diarréia com sangue ou necessidade de suporte parenteral	
92. Estomatite	(0) nenhuma (1) úlceras indolores, eritemas ou inflamação leve (2) eritema, edema ou úlcera dolorosos, mas pode comer (3) eritema, edema ou úlcera dolorosos e não pode comer (4) exige suporte enteral ou parenteral	
93. Bilirrubina	(0) DLN* (1) não marcar (2) $1,5 \times N^{**}$ (3) $1,5 - 3,0 \times N$ (4) $> 3,0 \times N$	
94. TGO	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
95. TGP	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
96. Fosf. Alcalina	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
97. Hb (g/100 ml)	(0) DLN (1) $10,0 - N$ (2) $8,0 - 9,9$ (3) $6,5 - 7,9$ (4) $< 6,5$	
98. Leucócitos (x 1000/mm³)	(0) $\geq 4,0$ (1) $3,0 - 3,9$ (2) $2,0 - 2,9$ (3) $1,0 - 1,9$ (4) $< 1,0$	

99. Granulócitos (x 1000/mm ³)	(0) $\geq 2,0$ (1) 1,5 – 1,9 (2) 1,0 – 1,4 (3) 0,5 – 0,9 (4) $< 0,5$	
100. Plaquetas (x 1000/mm ³)	(0) DLN (1) 75 - N (2) 50 – 74,9 (3) 25 – 49,9 (4) < 25	
101. Hemorragia (clínica)	(0) nenhuma (1) leve, sem transfusão (2) grande; 1-2 unidades de transfusão por episódio (3) grande; 3-4 unidades de transfusão por episódio (4) maciça, > 4 unidades de transfusão por episódio	
102. Toxicidade pulmonar	(0) nenhuma (1) assintomático, com alteração ao exame físico (2) dispnéia sob esforço (3) dispnéia sob nível normal de atividade (4) dispnéia em repouso	
103. Toxicidade cutânea	(0) ausente (1) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema assintomáticos (2) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema com prurido ou outros sintomas associados (3) máculas, pápulas ou erupções vesiculares sintomáticas generalizadas (4) dermatite esfoliativa ou ulcerativa	
104. Alopecia	(0) sem queda (1) perda leve (2) queda pronunciada ou total	
105. Infecção	(0) ausente (1) leve (2) moderada (3) grave (4) risco de vida	
106. Creatinina	(0) DLN (1) $< 1,5 \times N$ (2) 1,5 – 3,0 x N (3) 3,1 – 6,0 x N (4) $> 6,0 \times N$	
107. Hematúria	(0) negativo (1) somente microscópica (2) macroscópica, sem coágulos (3) com coágulos (4) requer transfusão	
108. Toxicidade cardíaca (função)	(0) ausente (1) assintomático, declínio da FE em repouso em menos de 20% do valor basal (2) assintomático, declínio da FE em repouso em mais de 20% do valor basal (3) ICC leve, responsiva a terapia (4) ICC grave ou refratária	
109. Toxicidade cardíaca	(0) ausente (1) assintomático, transitória ou sem	

(arritmias)	necessidade de terapia (2) recorrente ou persistente, sem necessidade de terapia (3) requer tratamento (4) requer monitorização ou hipotensão ou taquicardia ou fibrilação ventricular	
110. Toxicidade cardíaca (pericárdio)	(0) ausente (1) efusão assintomática, não requer transfusão (2) pericardite (atrato, dor torácica e alterações no ECG) (3) requer drenagem (4) tamponamento cardíaco	
111. Neurotoxicidade (sensorial)	(0) ausente (1) parestesias leves (2) perda sensorial objetiva leve a moderada (3) perda sensorial objetiva grave ou parestesias que interferem com a função	
112. Alívio de sintomas (relacionados ao tumor)	(0) não (1) sim	
113. Tamanho ao exame físico (maior diâmetro)		
4^a ciclo		
Caso este ciclo seja suspenso, vá para o item 140		
114. Data de início	(0) nenhuma (1) ingestão razoável (2) ingestão significativamente diminuída (3) sem ingestão oral (0) ausente (1) 1 episódio em 24 hs (2) 2-5 episódios em 24 hs (3) 6-10 episódios em 24 hs (4) > 10 episódios em 24 hs / necessidade de suporte parenteral (0) nenhuma (1) aumento 2-3 evacuações/dia em relação ao pré-tratamento (2) aumento de 4-6 evacuações/dia ou evacuações noturnas ou cólicas moderada (3) aumento de 7-9 evacuações/dia ou incontinência ou cólicas severas (4) aumento $\geq$ 10 evacuações/dia ou diarreia com sangue ou necessidade de suporte parenteral (0) nenhuma (1) úlceras indolores, eritemas ou inflamação leve (2) eritema, edema ou úlcera dolorosos, mas pode comer (3) eritema, edema ou	
115. Náuseas		
116. Vômitos		
117. Diarréia		
118. Estomatite		

	úlceras dolorosas e não pode comer (4) exige suporte enteral ou parenteral	
119. Bilirrubina	(0) DLN* (1) não marcar (2) $1,5 \times N^{**}$ (3) $1,5 - 3,0 \times N$ (4) $> 3,0 \times N$	
120. TGO	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
121. TGP	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
122. Fosf. Alcalina	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
123. Hb (g/100 ml)	(0) DLN (1) $10,0 - N$ (2) $8,0 - 9,9$ (3) $6,5 - 7,9$ (4) $< 6,5$	
124. Leucócitos (x 1000/mm³)	(0) $\geq 4,0$ (1) $3,0 - 3,9$ (2) $2,0 - 2,9$ (3) $1,0 - 1,9$ (4) $< 1,0$	
125. Granulócitos (x 1000/mm³)	(0) $\geq 2,0$ (1) $1,5 - 1,9$ (2) $1,0 - 1,4$ (3) $0,5 - 0,9$ (4) $< 0,5$	
126. Plaquetas (x 1000/mm³)	(0) DLN (1) $75 - N$ (2) $50 - 74,9$ (3) $25 - 49,9$ (4) < 25	
127. Hemorragia (clínica)	(0) nenhuma (1) leve, sem transfusão (2) grande; 1-2 unidades de transfusão por episódio (3) grande; 3-4 unidades de transfusão por episódio (4) maciça, > 4 unidades de transfusão por episódio	
128. Toxicidade pulmonar	(0) nenhuma (1) assintomático, com alteração ao exame físico (2) dispnéia sob esforço (3) dispnéia sob nível normal de atividade (4) dispnéia em repouso	
129. Toxicidade cutânea	(0) ausente (1) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema assintomáticos (2) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema com prurido ou outros sintomas associados (3) máculas, pápulas ou erupções vesiculares sintomáticas generalizadas (4) dermatite esfoliativa ou ulcerativa	
130. Alopecia	(0) sem queda (1) perda leve (2) queda pronunciada ou total	

131. Infecção	(0) ausente (1) leve (2) moderada (3) grave (4) risco de vida	
132. Creatinina	(0) DLN (1) $< 1,5 \times N$ (2) $1,5 - 3,0 \times N$ (3) $3,1 - 6,0 \times N$ (4) $> 6,0 \times N$	
133. Hematúria	(0) negativo (1) somente microscópica (2) macroscópica, sem coágulos (3) com coágulos (4) requer transfusão	
134. Toxicidade cardíaca (função)	(0) ausente (1) assintomático, declínio da FE em repouso em menos de 20% do valor basal (2) assintomático, declínio da FE em repouso em mais de 20% do valor basal (3) ICC leve, responsiva a terapia (4) ICC grave ou refratária	
135. Toxicidade cardíaca (arritmias)	(0) ausente (1) assintomático, transitória ou sem necessidade de terapia (2) recorrente ou persistente, sem necessidade de terapia (3) requer tratamento (4) requer monitorização ou hipotensão ou taquicardia ou fibrilação ventricular	
136. Toxicidade cardíaca (pericárdio)	(0) ausente (1) efusão assintomática, não requer transfusão (2) pericardite (atrato, dor torácica e alterações no ECG) (3) requer drenagem (4) tamponamento cardíaco	
137. Neurotoxicidade (sensorial)	(0) ausente (1) parestesias leves (2) perda sensorial objetiva leve a moderada (3) perda sensorial objetiva grave ou parestesias que interferem com a função	
138. Alívio de sintomas (relacionados ao tumor)	(0) não (1) sim	
139. Tamanho ao exame físico (maior diâmetro)		
Avaliação após o tratamento de indução		
140. Quantos ciclos de Qt completou	(0) nenhum (1) um (2) dois (3) três (4) quatro	

141. Motivo da interrupção	(0) completou os quatro ciclos (1) toxicidade (2) progressão tumoral Se alternativa (1) , definir qual toxicidade determinou a interrupção:	
142. Medida do maior diâmetro pelo exame de imagem		
143. Determinação da resposta clínica (TC ou RNM, de acordo com os critérios do RECIST)	(1) resposta completa (RC) (2) resposta parcial (RP) (3) doença estável (DE) (4) progressão de doença (PD)	
Dados da cirurgia		
144. Data da cirurgia		
145. Classificação da cirurgia quanto à ressecabilidade	(0) não operou (1) ressecção adequada (margens tridimensionais de 1,5 a 2,0 cm) (2) ressecção marginal (3) ressecção incompleta (doença macroscópica residual)	
146. Classificação da cirurgia quanto à extensão da ressecção	(0) não operou (1) ressecção de partes moles, com preservação do membro (2) ressecção alargada (vasos, nervos, osso ou vísceras), com preservação do membro (3) amputação ou desarticulação clássica (4) amputação ou desarticulação alargada	
147. Classificação quanto ao tipo de reconstrução	(0) não operou (1) retalho fáscio-cutâneo (2) retalho miocutâneo (3) reconstrução microcirúrgica	
148. Caso a resposta aos três itens anteriores for (0), Qual o motivo da suspensão da cirurgia	(0) não se aplica, pois operou (1) óbito por complicação da Qt (2) progressão local durante a Qt (3) progressão sistêmica	
149. Data da alta		

hospitalar		
150. Complicações pós-operatórias	(0) não houve (1) sim, relacionadas à FO (2) sim, mas não relacionadas à FO (3) sim; complicações clínicas no período pós-operatório (até 30º dia PO)	
151. Tipo de complicação cirúrgica	(0) não houve (1) hemorragia trans-operatória (2) hemorragia pós-operatória, com necessidade de reintervenção (3) hematoma de FO, sem necessidade de reoperação (4) seroma (5) deiscência de FO, sem infecção (6) infecção de FO (7) perda de retalho (quando rotação de miocutâneo ou microcirúrgico) (8) trombose de enxerto vascular	
152. Agente infeccioso isolado em caso de infecção		
153. Em caso de seroma, quantas punções foram realizadas?		
154. Tipo de complicação clínica	(0) não houve (1) infecção respiratória (2) embolia pulmonar (3) congestão pulmonar (4) IAM (5) TVP (6) descompensação de DM (7) AVC (8) outras	
Dados da Anatomia Patológica (peça cirúrgica) Número do exame:		
155. Tipo histológico		
156. Grau histológico	(1) baixo grau (2) alto grau	
157. Margens microscópicas	(0) não avaliadas (1) livres e amplas (2) livres, porém exíguas (3) comprometidas	
158. Porcentagem de necrose		
159. Porcentagem de		

células viáveis		
Dados da radioterapia adjuvante		
160. Realizou ?	(0) não (1) sim Se não, vá para o item 136	
161. Toxicidade aguda à Rxt	(0) não houve (1) dermatite grau ____ (2) neurotoxicidade grau ____	
Dados do seguimento		
162. Recidiva	(0) não (1) sim, local (2) sim, à distância (3) sim, local e à distância, sincronicamente	
163. Data da recidiva (1º sítio)		
164. Data da última informação ou consulta		
165. Status na última informação ou consulta	(1) vivo, sem doença (2) vivo, com doença (3) morte por outra causa (4) morte por câncer (5) perda de seguimento	

Caso nº

Anexo E
Protocolo – Laudo de Anatomia Patológica
Sarcomas/Partes moles (Peça)

Patologista: _____

Paciente: _____ nº

AP _____

Idade: _____

Sexo: _____

Localização: _____

Cirurgia realizada: _____

Exame macroscópico:

Medida da peça cirúrgica: _____ Peso: _____

Medida da neoplasia: _____

Medida da espessura das margens cirúrgicas em partes moles:

Necrose macroscópica (porcentagem estimada): _____

Hemorragia (porcentagem estimada): _____

Infiltração de Pele: _____

Infiltração de outras estruturas: _____

Outras alterações:

Obs:

- 1) As margens cirúrgicas deverão ser pintadas com tinta Nankin
- 2) Representação de uma fatia inteira do espécime, devendo-se escolher a área com menos necrose e mapeando-se com cortes numerados de 1 a 2 cm.

- 3) Avaliação da presença de células neoplásicas viáveis em cada lâmina, da mesma maneira como foi estabelecido em tumores ósseos (REF: Huvos A : bone tumours, diagnostic and prognosis)
- 4) Estabelecimento da Porcentagem de células viáveis e de necrose tumoral (estimadas por células viáveis em cada lâmina avaliada em relação ao total de lâminas examinadas.
- 5) Avaliação da presença de efeito citológico e fibrovascular/estromal, decorrentes do tratamento (fibrose estromal, atipias celulares....).

Exame microscópico:

Porcentagem de células viáveis na neoplasia (Obs 4)

Efeito citológico e fibrovascular do tratamento (Obs 5)

Invasão vascular sanguínea: _____

Invasão vascular linfática: _____

Invasão perineural: _____

Margens cirúrgicas: _____

Obs: Se esvaziamento linfonodal, especificar cadeias , nº de linfonodos comprometidos, nº de linfonodos avaliados e presença de efeitos decorrentes do tratamento (fibrose, necrose)

Esvaziamento linfonodal:

Cadeias:

nº de linfonodos avaliados: _____

nº de linfonodos comprometidos: _____

Efeitos decorrentes do tratamento (fibrose, necrose):

Biópsia(s) anterior(es): (n^{os})

Comentários:

Anexo F – planilha com as 222 seqüências identificadas após o teste t

Componente	Valor absoluto de t	Graus de liberdade	Razão A/B	Fold A/B	Símbolo do gene
RC0-AN0041-200700-033-f02	2,766	1	-2,682	-6,4184	HES1
MR2-NT0138-301100-004-h05	2,801	1	-2,564	-5,9133	AFF3
PM2-CN0030-230200-005-b03	6,787	1	-2,250	-4,7573	EDN3
MR0-RT0037-121200-004-b01	3,070	1	-2,188	-4,5566	
CM1-AN0080-011100-529-e02	15,264	3	-2,159	-4,4672	TRPS1
MR1-HN0068-121200-001-a03	2,719	1	-2,030	-4,0844	NTRK2
MR1-ST0110-021199-003-b09	2,218	1	-1,933	-3,8195	TLE1
QV4-NT0248-191100-567-d01	7,201	1	-1,903	-3,741	SOX8
PM0-BN0144-240500-003-e05	4,499	1	-1,846	-3,5944	CX3CL1
MR4-UM0021-300600-008-g09	2,963	1	-1,732	-3,322	AREG
QV3-OT0063-150600-229-d03	3,230	3	-1,645	-3,1276	NUBP1
QV4-NN0038-270400-187-e11	8,232	3	-1,644	-3,125	STRBP
RC0-NT0031-260400-021-f12	2,935	1	-1,644	-3,1249	NET1
MR0-BT0551-240200-101-c01	5,821	3	-1,629	-3,094	SIPA1L2
MR2-HN0034-211200-001-c03	1,679	1	-1,584	-2,9982	SLC25A29
MR4-TN0111-041000-103-f01	4,196	1	-1,556	-2,94	AUTS2
QV2-BT0636-291000-443-a10	1,971	1	-1,532	-2,891	NR2F2
QV3-BT0537-280100-070-g01	4,791	3	-1,510	-2,8477	BCL2
PM3-ET0207-210501-013-e04	6,239	3	-1,487	-2,804	RAP1GAP
RC2-BN0033-170300-019-f08	7,260	3	-1,479	-2,7869	RPL22
MR2-CI0128-141200-013-a11	3,791	3	-1,460	-2,7514	SEC23B
PM2-ST0303-070100-001-c12	1,997	1	-1,432	-2,6975	GPAM
CM0-BN0102-140300-285-d01	4,599	3	-1,371	-2,5866	NCOA1
PM3-TN0154-190900-004-f09	3,099	3	-1,358	-2,5639	AP2B1
MR3-HN0063-201200-007-h04	5,194	2	-1,327	-2,5082	RGS16

MR2-ST0131-211099-008-c02	6,714	1	-1,303	-2,4668	
MR4-KT0047-040501-001-d11	8,006	1	-1,294	-2,4513	CA11
CM0-CI0136-311000-655-c12	1,518	1	-1,276	-2,4213	ITGA6
QV0-UM0091-260500-245-b03	4,966	1	-1,274	-2,4183	CYFIP2
CM0-NN1010-130300-281-c05	3,191	1	-1,240	-2,3616	EFNB3
MR2-ST0131-211099-008-c08	2,370	3	-1,231	-2,3472	SSBP2
MR4-PT0052-060700-208-f11	5,811	3	-1,214	-2,3194	
IL0-HT0205-011199-138-h04	3,167	1	-1,198	-2,2944	NSF
PM3-NN1174-190501-031-e11	3,687	1	-1,192	-2,2844	KIAA0789
QV1-BN0395-081100-433-h10	5,712	3	-1,178	-2,2621	
MR0-HT0559-070300-004-g02	4,432	3	-1,176	-2,2592	ID2
CM0-TN0037-160800-505-e01	3,453	3	-1,130	-2,1882	ETNK2
QV0-HT0103-270999-023-e01	3,894	3	-1,125	-2,1811	TSPAN18
MR4-TN0115-180900-202-g12	5,213	1	-1,120	-2,1728	GDF10
PM0-HT0335-200600-011-b10	5,348	3	-1,117	-2,1689	AP3M1
QV1-UM0102-180400-165-d02	3,725	1	-1,116	-2,1678	
MR2-BT0590-140300-107-c04	2,293	3	-1,086	-2,1221	WWP1
MR0-HT0240-171299-003-g01	2,230	2	-1,083	-2,1189	MASA
RC3-BN0036-260400-015-e10	13,872	2	-1,074	-2,1051	PELI1
QV0-CT0225-021099-030-a12	3,852	3	-1,060	-2,0851	LOC401152
QV2-NN0045-221200-575-h11	5,024	3	-1,023	-2,0322	DOCK9
MR2-ST0130-131099-005-g07	1,787	1	-0,978	-1,9697	
PM0-CI0046-181000-001-H08	3,688	2	-0,949	-1,9308	MRPL49
RC3-CI0043-111100-013-g10	4,947	1	-0,945	-1,9253	PHIP
QV1-BT0260-281099-023-b12	5,598	3	-0,925	-1,899	BBS2
CM1-HB0002-131200-639-g10	2,641	1	-0,875	-1,8335	CDON
RC2-BN0015-060200-011-g06	3,286	1	-0,870	-1,8282	ASXL2
MR0-HT0923-150900-203-c05	2,533	3	-0,869	-1,8269	HIP1R
RC4-IT0014-211100-022-d12	5,797	1	-0,853	-1,8057	PVRL1

RC0-FN0140-200600-021-d06	2,299	3	-0,836	-1,7854	CD5
QV0-BT0701-290500-247-a11	2,181	3	-0,834	-1,783	TRUB1
MR2-EN0093-271200-005-h09	7,383	3	-0,797	-1,7374	ARL3
MR1-BN0213-100700-005-c10	3,305	2	-0,788	-1,7268	ATXN2
RC2-HT0977-131100-012-h12	2,152	3	-0,785	-1,7229	
QV3-OT0065-130700-264-a05	3,458	1	-0,776	-1,7129	ATIC
MR3-EN0090-111200-005-a07	2,592	3	-0,768	-1,703	FAM83E
PM3-HT0344-151299-004-d12	4,326	3	-0,752	-1,6844	NOTCH1
RC2-BT0841-021000-012-c04	4,557	3	-0,739	-1,6692	
CM0-TN0034-070800-494-d11	3,004	1	-0,733	-1,6617	SMARCE1
QV1-HT0516-070300-095-f04	2,540	1	-0,732	-1,6608	
RC0-NN1015-040400-021-f05	6,997	3	-0,715	-1,642	WFS1
QV3-IT0006-311000-406-g04	11,403	3	-0,706	-1,6314	NPTX2
CM2-BN0224-040500-180-e08	2,303	3	-0,702	-1,6268	CNOT6
MR1-UM0008-290200-002-a10	5,124	3	-0,672	-1,5936	LMAN2L
RC4-HT0890-250800-011-b12	4,250	3	-0,672	-1,5933	
MR3-EN0090-151200-006-h06	2,486	3	-0,672	-1,5929	SND1
QV2-OT0062-080500-203-h01	2,258	3	-0,668	-1,5892	IQCE
MR0-HT0559-240400-014-c11	1,563	2	-0,667	-1,5877	LOC145842
RC0-ST0280-271199-011-D02	1,899	2	-0,665	-1,5853	CCL25
QV1-FT0203-021100-449-h09	4,086	3	-0,651	-1,57	SRP72
QV0-BN0148-070700-293-g09	2,987	3	-0,641	-1,559	CRKRS
MR1-TN0046-060900-006-c02	2,388	3	-0,639	-1,5569	ABHD6
MR2-GN0030-180900-011-d03	5,018	1	-0,624	-1,5406	KIAA1914
MR2-UM0025-040400-104-f01	1,702	3	-0,619	-1,5358	PSKH1
RC2-BN0126-170300-011-h05	3,971	2	-0,617	-1,5333	HOXC4
RC0-BT0561-070100-031-h01	5,008	3	-0,601	-1,5164	IQCB1
CM4-LT0057-140100-080-a10	3,719	3	-0,599	-1,5142	
RC1-BT0313-301299-012-	4,387	3	-0,591	-1,5065	BCLAF1

g03				
PM0-OT0019-130600-005-A05	6,927	3	-0,590	-1,5057
PM3-BT0584-190100-001-a06	3,111	1	-0,589	-1,5042 EPRS
MR2-GN0123-241000-003-h05	5,147	3	-0,574	-1,4883 IER2
QV0-TN0055-250800-361-h05	3,030	3	-0,562	-1,4761 GLI2
CM2-HT0508-110300-115-g01	5,856	3	-0,558	-1,4723 TRAPPC6B
CM3-HT0769-010600-197-b06	5,971	3	-0,552	-1,466
MR0-HT0168-141199-002-a12	10,622	3	-0,550	-1,4639 KIRREL3
QV4-NT0027-150400-169-f05	3,049	2	-0,547	-1,4609 C3orf63
QV3-BN0047-300800-278-d08	2,559	3	-0,540	-1,454 ZNF462
MR0-HT0209-010500-110-b01	3,561	1	-0,538	-1,4524 ZNF513
MR3-SN0010-270300-105-c04	2,823	3	-0,534	-1,4484 CEP192
RC5-FN0022-040700-032-D03	4,097	3	-0,533	-1,4468 UBE4A
RC5-CT0597-011100-021-B02	2,994	3	-0,517	-1,4307 GUCY2C
RC4-HT0742-180500-011-h06	6,121	3	-0,516	-1,43 IKBKAP
QV4-GN0143-271100-579-d03	2,722	3	-0,496	-1,4101 DUSP9
RC1-IT0025-241100-011-h11	2,846	3	-0,490	-1,4041 PTPN9
QV1-UM0099-110400-144-g11	4,048	1	-0,487	-1,402 C10orf35
QV4-MT0050-220600-262-e03	4,538	3	-0,482	-1,3967 C14orf104
CM3-FN0073-080600-206-b09	4,413	3	-0,465	-1,3799 ZMYM4
CM3-BN0151-130400-146-g05	9,957	3	-0,453	-1,3691 PRMT2
MR4-NT0141-181100-101-c02	2,442	1	-0,443	-1,3597 C8orf38
CM1-CI0134-161100-551-d12	2,316	1	-0,416	-1,3342 ACTR6
CM1-NN0193-191000-475-e02	5,484	3	-0,412	-1,3305 SV2A
QV4-HT0539-310800-382-e12	3,757	3	-0,405	-1,3242 ALG11
MR0-NN1081-091100-001-d11	3,037	3	-0,402	-1,3213
QV2-LT0053-090400-120-b05	2,881	3	-0,395	-1,3149 ZCCHC8
RC1-BT0609-210100-011-f01	4,671	3	-0,394	-1,3142 CYB5D2
MR3-UT0050-120900-008-f10	6,131	3	-0,388	-1,3086 C6orf111

QV3-TN0167-111100-416-f05	2,250	1	-0,369	-1,2916	ZNF350
QV1-KT0023-131100-480-h09	3,373	3	-0,351	-1,2757	IGSF3
MR2-NN1111-030800-005-g11	1,730	3	-0,339	-1,2645	CRSP8
CM0-BT0615-140200-175-a08	2,837	3	-0,311	-1,2404	GAB1
QV1-KT0023-111100-479-h11	3,874	3	-0,306	-1,236	
MR2-NN1111-070800-007-h08	3,053	1	-0,263	-1,2002	AKNA
CM1-BN0178-270600-289-d06	2,355	3	-0,253	-1,1917	
PM0-CT0263-151099-001-f05	2,483	3	-0,246	-1,1863	
MR4-NT0140-080101-209-g12	3,200	2	-0,245	-1,1853	SLITRK5
MR0-GN0024-290800-004-g08	2,476	3	-0,244	-1,1843	PAPPA2
RC4-GN0324-281200-022-c05	1,552	3	-0,237	-1,1782	GDF15
IL3-CT0213-210200-042-E05	3,650	2	-0,236	-1,178	NFKB2
QV2-HT0577-160500-220-f01	3,320	2	-0,217	-1,1621	IPO13
QV0-EN0059-261000-444-c05	5,060	3	-0,214	-1,1595	FBXL7
MR3-ST0203-040100-022-c02	2,287	3	-0,213	-1,1589	SPRED2
QV0-BN0148-120500-217-h07	2,397	3	-0,192	-1,1423	ATM
MR1-HT1068-291100-005-h03	2,670	3	-0,176	-1,13	PREPL
QV3-NT0022-230800-311-e06	2,375	1	-0,175	-1,1288	PARD3
QV1-NN0228-091100-440-a06	1,881	3	-0,156	-1,1142	CCRK
MR0-HT0166-271199-005-c06	2,075	3	-0,152	-1,1112	SH3BGRL2
RC0-HT0862-080800-032-g12	1,833	3	-0,133	-1,0964	GAD1
RC1-BT0314-030300-014-f10	2,334	3	-0,107	-1,0773	SF3A2
MR4-NN1197-080501-003-g12	4,901	3	0,075	1,05365	C17orf75
MR0-HT0157-310300-010-g04	2,094	2	0,076	1,054	PIM2
CM0-CT0549-210900-565-b05	2,712	3	0,131	1,09503	MAP4K4
QV1-HT0471-270300-121-b04	3,573	3	0,155	1,11362	RPP25
QV1-GN0065-140800-323-b03	4,123	3	0,157	1,11489	NOS3
MR4-LT0076-050900-010-b07	2,495	2	0,175	1,12876	DLG4
CM0-GN0111-181100-568-	2,765	3	0,193	1,1428	KIAA0256

b11					
PM3-HT0344-091199-001-h08	4,578	2	0,195	1,14469	LRP1B
MR1-CT0390-070800-001-e10	7,967	3	0,199	1,14756	PHF20L1
MR2-HN0036-241100-007-f07	3,179	3	0,199	1,14783	DYRK4
CM3-NN0006-110300-113-b06	4,592	3	0,236	1,17773	PPP1R15B
MR1-CI0021-161000-004-e09	1,948	3	0,260	1,19781	RNF123
MR1-HT1064-271200-012-a10	1,968	1	0,275	1,20977	SRP19
QV2-NN0045-071200-527-c10	2,712	3	0,282	1,21569	PEX12
PM3-BN0011-130100-002-f09	2,645	3	0,289	1,22169	CCDC126
QV1-MT0133-021100-437-b06	3,252	1	0,298	1,22907	
QV1-HT0638-150500-200-f10	3,635	3	0,300	1,2308	UNQ1887
PM0-UM0018-060700-004-h06	1,553	3	0,328	1,25528	PARP12
QV0-TT0009-161199-052-h06	2,334	1	0,333	1,25998	MED25
QV3-NN1023-260400-168-c02	4,721	3	0,336	1,26236	
MR0-NN0087-180500-006-d11	2,675	3	0,339	1,2649	NPTX1
RC2-HT0221-061199-031-e09	4,763	3	0,348	1,2731	KPNA6
MR1-CI0183-071100-001-e11	8,667	3	0,368	1,29015	ZNF436
MR1-CT0355-180200-007-a02	3,474	3	0,377	1,2988	
RC4-CN0081-091200-011-a12	3,118	1	0,379	1,30041	CANT1
QV4-OT0035-120900-393-h10	2,575	3	0,398	1,31728	UBE1L
IL3-CT0220-051199-027-E01	3,386	3	0,415	1,3333	PRMT5
MR2-GN0123-061100-007-g08	4,553	3	0,432	1,34956	MAPKAPK2
QV3-HT0544-220300-131-e02	2,703	3	0,433	1,3498	IFNAR2
QV1-NN0228-091100-436-d04	4,397	3	0,437	1,35419	ATP13A2
CM0-MT0031-150600-430-b03	1,573	2	0,471	1,38611	DIRC2
PM3-FN0213-041200-002-d11	3,096	1	0,480	1,39443	ADAM15
PM0-TN0030-210800-001-e07	2,162	1	0,486	1,40027	HMGB4
CM0-AN0004-120800-517-b06	2,871	3	0,492	1,40679	
PM3-FT0024-080600-003-e06	1,760	3	0,540	1,45351	SSR3

MR3-ST0290-290100-025-d12	2,531	3	0,564	1,4787	C1orf212
QV1-CT0417-080800-305-g11	4,727	3	0,589	1,50389	SH3PX3
RC4-CN0007-130900-016-g04	2,409	1	0,621	1,53767	POLDIP2
MR2-GN0123-071100-001-a05	2,905	3	0,641	1,55938	FLJ12716
PM0-HT0911-191000-004-f09	3,391	1	0,658	1,57802	YME1L1
QV1-HT0516-140300-107-e02	6,178	3	0,669	1,58977	RASSF5
QV1-FT0203-131100-468-h06	2,099	3	0,684	1,60615	RPRC1
QV3-ET0171-231100-492-a10	2,810	1	0,685	1,60748	USP14
QV4-GN0120-021000-428-a03	4,000	3	0,703	1,62838	NEDD9
CM1-UM0040-070400-179-d04	4,659	3	0,731	1,65996	KCTD10
CM3-LT0079-170200-092-e12	5,047	3	0,732	1,66077	ANKRD28
MR0-NN1120-120800-102-h10	2,651	3	0,732	1,66146	WDR1
RC0-ST0280-021299-031-d02	2,926	3	0,766	1,70094	ACSL4
CM0-LT0066-020300-260-c01	1,593	3	0,789	1,72764	MERTK
CM0-HT0331-131299-125-a02	3,802	3	0,837	1,78576	
PM3-AN0029-130700-001-a10	3,008	1	0,861	1,81585	
MR0-GN0024-180800-002-a06	2,823	3	0,970	1,95896	PDGFRL
MR3-CT0465-300800-005-f05	2,889	3	0,988	1,98337	SSH1
RC0-BN0125-130300-021-c01	1,912	3	1,010	2,01451	GLIS3
RC2-BT0388-290100-012-e04	2,933	3	1,012	2,01659	AGTR1
QV1-KT0023-131100-480-c02	2,937	3	1,023	2,03156	ECM1
RC0-CT0205-270999-011-b09	1,921	1	1,058	2,08207	BACH1
MR2-NT0136-161100-009-f01	2,434	3	1,061	2,08588	SMPD1
QV3-NT0216-061200-517-h03	4,242	3	1,094	2,13432	C9orf19
MR2-BN0386-011100-012-c01	2,652	3	1,153	2,22404	LTBP1
QV3-LT0048-010300-109-a03	3,821	3	1,244	2,36889	CTHRC1
MR4-TN0112-171100-206-b05	2,319	1	1,251	2,37933	CHMP5
QV4-UM0095-010900-391-g04	2,243	3	1,259	2,39378	COL6A3

QV4-HT0894-170800-362-d11	3,192	1	1,319	2,49578	
MR2-CN0035-220300-204-e05	2,718	1	1,333	2,51909	ABHD3
PM2-DT0023-050400-003-a12	4,528	3	1,342	2,53503	OXCT1
QV0-ST0215-300300-177-a12	5,168	3	1,419	2,67383	GJA4
MR3-SN0010-310300-107-c04	2,668	1	1,450	2,73205	UBE2Q2
CM0-ET0122-311000-657-f04	2,317	3	1,465	2,76058	
RC2-LT0007-300800-013-f10	3,128	3	1,498	2,82461	RHOBTB1
RC2-AN0062-070800-014-a11	4,345	1	1,539	2,90601	TMEM49
MR1-HN0069-261200-010-c02	3,133	2	1,554	2,9354	ITGA5
MR2-GN0123-241000-003-a05	2,247	1	1,585	2,99931	TGFB1
CM1-TN0141-140900-407-g12	5,131	2	1,679	3,20278	ANKRD25
MR3-KT0050-220101-003-d07	3,273	3	1,715	3,28353	PKIG
QV2-OT0062-010500-177-c08	4,355	1	1,719	3,29247	FST
QV0-NN1022-260500-246-b02	2,154	3	1,737	3,33267	IQWD1
MR3-ST0203-040100-022-f02	3,969	3	1,762	3,39198	ME1
CM2-HT0283-121199-031-d03	3,532	1	1,765	3,39978	C9orf30
RC0-LT0001-071299-011-h09	4,513	2	1,787	3,45011	MARCH8
MR1-GN0173-271100-014-f09	2,372	3	1,840	3,5806	BCAT1
QV4-HT0893-030800-333-c07	4,396	3	1,975	3,92993	
RC4-OT0071-240400-014-g04	8,882	3	2,075	4,21428	SGK
MR0-BN0070-270300-008-c11	3,242	1	2,085	4,2418	GAS1
CM1-BN0020-170200-120-g03	4,482	1	2,089	4,25338	
RC4-LT0055-130200-011-h01	3,048	3	2,105	4,30141	MMP13
CM0-ET0124-311000-664-a01	3,858	3	2,679	6,40353	MMP11
RC4-CN0050-140100-011-a11	3,899	2	3,098	8,56399	PLAUR
CM3-LT0079-170200-092-e09	10,038	3	3,382	10,4249	EDIL3

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- American Cancer Society.: Cancer Facts and Figures 2007. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2007. Available from: <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2007PWSecured.pdf>.
- 2- Brennan M, Singer S, Maki R: Sarcomas of the soft tissues and bone. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds.: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 7th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, pp 1581-1631.
- 3- Lopes A, Nakagawa WT, Ferreira FO. Princípios da cirurgia e planejamento terapêutico. In: Lopes A. *Sarcomas de partes moles*. Rio de Janeiro: Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 1999. p 113-27.
- 4- Cormier JN, Pollock R. Soft tissue sarcomas. *CA Cancer J Clin*. 2004; 54: 94-109.
- 5- Khanfir K, Alzieu L, Terrier P, Le Pechoux C, Bonvalot S, Vanel D, et al. Does adjuvant radiation therapy increase loco-regional control after optimal resection of soft-tissue sarcoma of the extremities? *Eur J Cancer*. 2003; 39: 1872-80.
- 6- Pisters PWT, O'Sullivan B, Maki RG. Evidence-based recommendations for local therapy for soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 1003-8.
- 7- Lindberg RD, Martin RG, Romsdahl MM, Barkley HT Jr. Conservative surgery and postoperative radiotherapy in 300 adults with soft tissue sarcomas. *Cancer*. 1981; 47: 2391-7.
- 8- Brennan MF, Casper ES, Harrison LB, Shiu MH, Gaynor J, Hadju SI. The role of multimodality therapy in soft tissue sarcoma. *Ann Surg*. 1991; 214: 328-36.

- 9- Pisters PW, Harrison LB, Leung DH, Woodruff JM, Casper ES, Brennan MF.
Long-term results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol*. 1996; 14: 859-68.
- 10- Yang JC, Chang AE, Baker AR, Sindelar WF, Danforth DN, Topalian SL, et al.
Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 197-203.
- 11- Mocellin S, Rossi CR, Brandes A, Nitti D. Adult soft tissue sarcomas:
conventional therapies and molecularly targeted approaches. *Cancer Treatment Reviews*. 2006; 32:9-27.
- 12- Pisters PWT, Ballo MT, Patel SR. Preoperative chemoradiation treatment
strategies for localized sarcoma. *Ann Surg Oncol*. 2002; 9: 535-42.
- 13- O'Sullivan B, Davis AM, Turcotte R, Bell R, Catton C, Chabot P, et al.
Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *Lancet*. 2002; 359: 2235-41.
- 14- Weitz J, Antonescu CR, Brennan MF. Localized extremity soft tissue sarcoma:
improved knowledge with unchanged survival over time. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 2719-25.
- 15- Bramwell VHC. Controversies in surgical oncology: routine anthracycline-based
adjuvant chemotherapy for stage III extremity soft tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol*. 2007; 14: 1254-6.
- 16- Bramwell VHC. When to consider adjuvant/neoadjuvant therapy for adult soft-tissue sarcoma. *Oncology*. 2007; 21: 511-4.

- 17- Sarcoma Meta-analysis Collaboration. Adjuvant chemotherapy for localised resectable soft-tissue sarcoma of adults: meta-analysis of individual data. *Lancet*. 1997; 350: 1647-54.
- 18- Benjamin RS. Evidence for using adjuvant chemotherapy as standard treatment of soft tissue sarcoma. *Semin Radiat Oncol*. 1999; 9: 349-51.
- 19- Verweij J, Seynaeve C. The reason for confining the use of adjuvant chemotherapy in soft tissue sarcoma to the investigational setting. *Semin Radiat Oncol*. 1999; 9: 352-9.
- 20- Frustaci S, Gherlinzoni F, De Paoli A, Bonetti M, Azzarelli A, Comandone A, et al. Adjuvant chemotherapy for adult soft tissue sarcomas of the extremities and girdles: results of the Italian randomized cooperative trial. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 1238-47.
- 21- Bramwell VHC. Adjuvant chemotherapy for adult soft tissue sarcoma: is there a standard of care? *J Clin Oncol*. 2001; 19: 1235-7.
- 22- Cormier JN, Huang X, Xing Y, Thall PE, Wang X, Benjamin BS, et al. Cohort analysis of patients with localized, high-risk, extremity soft tissue sarcoma treated at two cancer centers: chemotherapy-associated outcomes. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 4567-74.
- 23- Phase III Randomized Study of Adjuvant High-Dose Doxorubicin and Ifosfamide Plus Filgrastim (G-CSF) Versus No Adjuvant Chemotherapy and G-CSF After Definitive Surgery in Patients With High-Grade Soft Tissue Sarcoma (EORTC-62931). Available from:
<http://www.cancer.gov/search/ViewClinicalTrials.aspx?>

- 24- Pisters PWT. Combined modality treatment of extremity soft tissue sarcomas. *Ann Surg Oncol*. 1998; 5: 464-72.
- 25- Pisters PWT. Chemoradiation treatment strategies for localized sarcoma: conventional and investigational approaches. *Semin Surg Oncol*. 1999; 17: 66-71.
- 26- DeLaney TF, Spiro IJ, Suit HD, Gebhardt MC, Hornicek FJ, Mankin HJ, et al. Neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy for large extremity soft-tissue sarcomas. *Int J Radiation Oncol Biol Phys*. 2003; 56: 1117-27.
- 27- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92: 205-16.
- 28- Kraybill WG, Harris J, Spiro IJ, Ettinger DS, Delaney TF, Blumm RH, et al. Phase II study of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the management of high-risk, high-grade, soft tissue sarcomas of the extremities and body wall: Radiation Therapy Oncology Group Trial 9514. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 619-25.
- 29- Pisters PWT. Preoperative chemotherapy and split-course radiation therapy for localized soft tissue sarcomas: home run, base hit, or strike out? *J Clin Oncol*. 2006; 24: 549-51.
- 30- Henshaw RM, Priebat DA, Perry DJ, Shmmokler BM, Malawer MM. Survival after induction chemotherapy and surgical resection for high-grade soft tissue sarcoma. Is radiation necessary? *Ann Surg Oncol*. 2001; 8: 484-95.

- 31- Gortzak E, Azzarelli A, Buesa J, Bramwell VHC, van Coevorden F, van Geel AN, et al. A randomised phase II study on neo-adjuvant chemotherapy for “high-risk” adult soft-tissue sarcoma. *Eur J Cancer*. 2001; 37: 1096-1103.
- 32- Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. *AJCC Cancer Staging Manual* – 6th ed. New York: Springer-Verlag; 2002. p. 193-200.
- 33- Pisters PWT, Leung DHY, Woodruff J, Shi W, Brennan MF. Analysis of prognostic factors in 1041 patients with localized soft tissue sarcomas of the extremity. *J Clin Oncol*. 1996; 14: 1679-89.
- 34- Coindre JM, Terrier P, Guillou L, Le Doussal V, Collin F, Ranchere D, Sastre X, et al. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Cancer*. 2001; 91: 1914-26.
- 35- Stojadinovic A, Leung DHY, Allen P, Lewis JJ, Jaques DP, Brennan MF. Primary adult soft tissue sarcoma: time-dependent influence of prognostic variables. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 4344-52.
- 36- O’Sullivan B, Catton CN. Soft Tissue Sarcomas. In: Gospodarowicz MK, O’Sullivan B, Sobin LH eds: *Prognostic Factors in Cancer*. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006, pp. 181-6.
- 37- Zucman J, Delattre O, Desmaze C, Plougastel B, Joubert I, Melot T, et al. Cloning and characterization of the Ewing’s sarcoma and peripheral neuroepithelioma t(11;22) translocations breakpoints. *Genes Chromossomes Cancer*. 1992; 5: 271-7.

- 38- Ginsberg JP, de Alava E, Ladanyi M, Wexler LH, Kovar H, Paulussen M, et al.
EWS-FL11 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 1809-14.
- 39- Kelly KM, Womer RB, Sorensen PH, Xiong QB, Barr FG. Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol.* 1997; 15: 1831-6.
- 40- Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, et al.
PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 2672-9.
- 41- Ladanyi M, Antonescu CR, Leung DH, Woodruff JM, Hawai A, Healey JH, et al.
Impact of SYT-SSX fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective study of 243 patients. *Cancer Res.* 2002; 62: 135-40.
- 42- Guillou L, Benhattar J, Bonichon F, Gallagher G, Terrier P, Stauffer E, et al.
Histologic grade, but not SYT-SSX fusion type, is an important prognostic factor in synovial sarcoma patients. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 4040-50.
- 43- Oliveira AM, Fletcher CDM. Molecular prognostication for soft tissue sarcomas: are we ready yet? *J Clin Oncol.* 2004; 22: 4031-4.
- 44- Ottaviano A, de Chiara A, Fazioli F, Talamanca AA, Mori S, Botti G, et al.
Biological prognostic factors in adult soft tissue sarcomas. *Anticancer Research.* 2005; 25: 4519-26.
- 45- Huang HI, Illei PB, Zhao Z, Mazumbar M, Huvos AG, Healey JH, et al. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly

- lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 548-58.
- 46- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995; 270: 467-70.
- 47- Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, Reis EM, Neves EJ, Souza SJ, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol Hemotol*. 2005; 54: 95-105.
- 48- Nagayama S, Katagiri T, Tsunoda T, Hosaka T, Nakashima Y, Araki N, et al. Genome-wide analysis of gene expression in synovial sarcomas using a cDNA microarray. *Cancer Res*. 2002; 62: 5859-66.
- 49-Allander SV, Illei PB, Chen Y, Antonescu CR, Bittner M, Ladanyi M, Meltzer PS. Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays: association of ERBB2, IGFBP2, and ELF3 with epithelial differentiation. *Am J Pathol*. 2002; 161: 1587-95.
- 50-Fritz B, Schubert F, Wrobel G, Schwaenen C, Wessendorf S, Nessling M, et al. *Cancer Res*. 2002; 62: 2993-8.
- 51-Nielsen TO, West RB, Linn SC, Alter O, Knowling MA, O'Connell JX, et al. Molecular characterisation of soft tissue tumors: a gene expression study. *Lancet*. 2002; 359: 1301-7.
- 52- Skubitz K, Skubitz APN. Differential gene expression in leiomyosarcoma. *Cancer*. 2003; 98: 1029-38

- 53- Skibutz KM, Cheng EY, Clohisy DR, Thompson RC, Skibutz AM. Differential gene expression in liposarcoma, lipoma and adipose tissue. *Cancer Invest.* 2005; 23: 105-18.
- 54- Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UR, Walker RL, Chen Y, et al. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res.* 2005; 65: 9226-35.
- 55- Nakayama R, Nemoto T, Takahashi H, Ohta T, Kawai A, Seki K, et al. Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocytoma. *Mod Pathol.* 2007; 20: 749-59
- 56- Ohali A, Avigad S, Zaizov R, Ophir R, Horn-Saban S, Cohen IJ, et al. Prediction of high risk Ewing's sarcoma by gene expression profiling. *Oncogene.* 2004; 23: 8997-9006.
- 57- Lee YF, John M, Falconer A, Edwards S, Clark J, Flohr P, et al. A gene expression signature associated with metastatic outcome in human leiomyosarcomas. *Cancer Res.* 2004; 64: 7201-4.
- 58- Fernebro J, Francis P, Eden P, Borg A, Panagopoulos I, Mertens F, et al. Gene expression profiles relate to SS18 / SSX fusion type in synovial sarcoma. *Int J Cancer.* 2006; 118: 1165-72.
- 59- Francis P, Namlos HM, Müller C, Edén P, Fernebro J, Berner JM, et al. Diagnostic and prognostic gene expression signatures in 177 soft tissue sarcomas: hypoxia-induced transcription profile signifies metastatic potential. *BMC Genomics.* 2007; 8: 73.

- 60- Ochi K, Daigo Y, Katagiri T, Nagayama S, Tsunoda T, Myoui A, et al.
Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma by gene-expression profiles. *Int J Oncol.* 2004; 24: 647-655.
- 61- Mintz MB, Sowers R, Brown KM, Hilmer SC, Mazza B, Huvos AG, et al. An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. *Cancer Res.* 2005; 65: 1748-54.
- 62- Man TK, Chintagumpala M, Visvanathan J, Shen J, Perlaky L, Hicks J, et al.
Expression profiles of osteosarcoma that can predict response to chemotherapy. *Cancer Res.* 2005; 65: 8142-50.
- 63- Stauton JE, Slonin DK, Collier HA, Tamayo P, Angelo MJ, Park J, et al.
Chemosensitivity prediction by transcriptional profiling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 10787-92.
- 64- Lehnhardt M, Hitpass-Klein L, Kuhnen C, Homann HH, Daigle A, Steinau HU, et al. Response rate of fibrosarcoma cells to cytotoxic drugs on the expression level correlates to the therapeutic response rate of fibrosarcomas and is mediated by regulation of apoptotic pathways. *BMC Cancer.* 2005; 5: 74.
- 65- Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone.* Geneva: World Health Organization; 2002.
- 66- Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993; 15: 532-4, 536-7.
- 67- Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry.* 1987; 162 (1): 156-9.

- 68- Bittner M, Butow R, Derisi J, Diehn M, Eberwine J, Epstein CB, Glynne R, et al. Expression analysis of RNA. In: Bowtell D and Sambrook Joseph. *DNA Microarrays - A Molecular Cloning Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. p. 101–279.
- 69- Van Gelder RN, Von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad USA*. 1990; 87 (5): 1663-1667.
- 70- Eberwine J, Yeh H, Miyashiro K, Cao Y, Nair S, Finnell R, Zettel M, Coleman P. Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89 (7): 3010-3014.
- 71- Phillips J, Eberwine JH. Antisense RNA amplifications: a linear amplification method for analyzing the mRNA population from single living cells. *Methods*. 1996; 10 (3): 283-288.
- 72- Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol*. 2000; 18 (4): 457-9.
- 73- Zhao H, Hastie T, Whitfield ML, Borresen-Dale A and Jeffrey SS. Optimization and evaluation of T7 based RNA linear amplification protocols for cDNA microarray analysis. *BMC genomics*. 2002; 3 (1): 31.
- 74- Gomes LI, Silva RLA, Stolf BS, Cristo EB, Hirata RJ, Soares FA, et al. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. *Analytical Biochemistry*. 2003; 321(2): 248–255.
- 75- Pollack JR. RNA Common Reference Set. In Bowtell D & Sambrook, J. *DNA microarrays: a molecular cloning manual*. 2003.

- 76- Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96:9212-7.
- 77- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406:747-52.
- 78- Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*. 2000; 24:227-35.
- 79- Cox WG, Singer VL. Fluorescent DNA hybridization probe preparation using amine modification and reactive dye coupling. *Biotechniques*. 2004; 36: 114-22.
- 80- Folgueira MAAK, Carraro DM, Brentani H, Patrão DFC, Barbosa EM, Mourão Netto M, et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:7434-43.
- 81- Gomes LI, Esteves GH, Carvalho AF, Cristo EB, Hirata R Jr, Martins WK, et al. Expression profile of malignant and nonmalignant lesions of esophagus and stomach: differential activity of functional modules related to inflammation and lipid metabolism. *Cancer Res*. 2005; 65:7127-36.
- 82- Hidai C, Zupancic T, Penta K, Mikhail A, Kawana M, Quertermous EE, et al. Cloning and characterization of developmental endothelial locus1: an embryonic endothelial cell protein that binds the avb3 integrin receptor. *Genes Dev*. 1998; 12: 21-33.
- 83- Penta K, Varner JA, Liaw L, Hidai C, Schatzman R, Quertermous T. Del1 induces integrin signaling and angiogenesis by ligation of avb3. *J Biol Chem*. 1998; 274: 11101-9.

- 84- Aoka Y, Johnson FL, Penta K, Hirata K, Hidai C, Schatzman R, et al. The embryonic angiogenic factor Del1 accelerates tumor growth by enhancing vascular formation. *Microvasc Res.* 2002; 64: 148-61.
- 85- Alfano D, Franco P, Vocca I, Gambi N, Pisa V, Mancini A, et al. The urokinase plasminogen activator and its receptor. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 205-11.
- 86- Mazzieri R, Blasi F. The urokinase receptor and the regulation of cell proliferation. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 641-6.
- 87- Crowley CW, Cohen RL, Lucas BK, Liu G, Shuman MA, Lavinson AD. Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 5021-5.
- 88- Min HY, Doyle LV, Vitt CR, Zandonella CR, Stratton-Thomas JR, Shuman MA, Rosenberg S. Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngeneic mice. *Cancer Res.* 1996; 56: 2428-33.
- 89- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 161-73.
- 90- Bray SJ. Notch signaling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 678-89.
- 91- Karlsson C, Brantsing C, Svensson T, Brisby H, Asp J, Tallheden T, Lindahl A. Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors. *J Orthop Res.* 2007; 25: 152-63.
- 92- Leyden J, Murray D, Moss A, Arumuguma M, Doyle E, McEntee G, et al. Net1 and Myeov: computationally identified mediators of gastric cancer. *Br J Cancer.* 2006; 94: 1204-12.

- 93- Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-cancer therapy? *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63: 755-9.
- 94- Willmarth NE, Ethier SP. Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2006; 281: 37728-37.
- 95- Brier B, Moses HL. TGF β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 506-20.
- 96- Wunder JS, Nielsen OT, Maki RG, O'Sullivan B, Alman BA. Opportunities for improving the therapeutic ratio for patients with sarcoma. *Lancet Oncol.* 2007; 8: 513-24.
- 97- Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess H, et al. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 2284-93.
- 98- Thuerigen O, Schneeweiss A, Toedt G, Warnat P, Hahn M, Kramer H, et al. Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 1839-45.
- 99- Rongrong G, Rajeev V, Partha R, Lattime E, Rittling S, Medicherla S, et al. Inhibition of growth and metastasis of mouse mammary carcinoma by selective inhibitor of transforming growth factor- β type I receptor kinase in vivo. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 4315-29.
- 100- Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 2006; 57: 1-18.

- 101- Gasparini G, Longo R, Fanelli M, Teicher BA. Combination of antiangiogenic therapy with others anticancer therapies: results, challenges, and open questions. *J Clin Oncol*. 2005; 23: 1295-311.
- 102- Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Östman A. High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 806-12.
- 103- Tseng JF, Ballo MT, Langstein HN, Wayne JD, Cormier JN, Hunt KK, et al. The effect of preoperative radiotherapy and reconstructive surgery on wound complications after resection of extremity soft-tissue sarcomas. *Ann Surg Oncol*. 2006; 13: 1209-15.
- 104- Temple CLF, Ross DC, Magi E, DiFrancesco LM, Kurien E, Temple WJ. Preoperative chemoradiation and flap reconstruction provide high local control and low wound complication rates for patients undergoing limb salvage surgery for upper extremity tumors. *J Surg Oncol*. 2007; 95: 135-41.
- 105- Leyvraz S, Herrmann R, Guillou L, Honegger HP, Christinat A, Fey MF, et al. Treatment of advanced soft-tissue sarcomas using a combined strategy of high-dose ifosfamide, high-dose doxorubicin and salvage therapies. *Br J Cancer*. 2006; 95: 1342-7.
- 106- Eilber FC, Rosen G, Eckardt J, Forscher C, Nelson SD, Selch M, et al. Treatment-induced pathologic necrosis: a predictor of local recurrence and survival in patients receiving neoadjuvant therapy for high-grade extremity soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 3203-9.
- 107- Menendez LR, Ahlmann AR, Savage K, Cluck M, Fedenko AN. Tumor necrosis has no prognostic value in neoadjuvant chemotherapy for soft tissue sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 2007; 455: 219-24.

108- Benjamin RS, Choi H, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, Chen LL, et al.

We should desist using RECIST, at least in GIST. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 1760-

4.

109- Burton A. RECIST: right time to renovate? *Lancet Oncol.* 2007; 8: 464-5.