Erica Boldrini

**Estudo da associação das variáveis clínico-
patológicas com a expressão imunoistoquímica de
Ezrin e CD44 em pacientes portadores de
osteossarcoma**

**Dissertação para obtenção de título de Mestre
apresentada à Universidade de São Paulo**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Profª Dra. Beatriz de Camargo

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Boldrini, Erica

Estudo da associação das variáveis clínico-patológicas com a expressão
imunoistoquímica de Ezrin e CD44 em pacientes portadores de osteossarcoma /
Erica Boldrini. -- São Paulo, 2010.

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

Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Beatriz de Camargo.

Descritores: 1. Osteossarcoma 2. Metástase neoplásica 3. Imunoistoquímica
4. Prognóstico.

USP/FM/SBD-075/10

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, que não viu essa obra finalizada.

Ao meu marido, pelo apoio, paciência e carinho fundamental para a realização deste trabalho.

A minha filha, motivo de incentivo e alegria.

A minha mãe, irmãos, cunhados e sogros pelo apoio incondicional e por estarem sempre prontos para ajudar.

AGRADECIMENTOS

A Profª. Dra Beatriz de Camargo, minha orientadora e grande incentivadora, pela dedicação e amizade que tornou possível a realização dessa dissertação.

A direção do Hospital de Câncer de Barretos, indispensáveis para alcançarmos nossos objetivos.

Aos pacientes e familiares, pela confiança.

A todos os colegas do departamento de Pediatria.

Ao Profº. Dr. Fernando Soares do Departamento de Patologia do Hospital A.C. Camargo e sua equipe pela construção das lâminas.

A Dra Sandra Morini do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos, pela leitura e interpretação das lâminas.

A Dra Leonir Feltrin do Departamento de Radiologia do Hospital de Câncer de Barretos, pela avaliação radiológica do tamanho dos tumores.

A Stella Peres do Núcleo de Apoio ao Pesquisador, pela realização do estudo estatístico.

A Rosi Arruda, Elizângela e Marinalva Aragão pela tão valiosa ajuda à distância, assim como a toda a equipe da pós-graduação da USP SP.

Ao Prof. Dr. André Carvalho, Dra Cecília Costa e Prof. Dr. Sérgio Petrilli pelas sugestões dadas na qualificação.

A Sra Suely Francisco pela revisão desta dissertação.

A bibliotecária do Hospital de Câncer de Barretos Daniele, pelo pronto atendimento na requisição de artigos.

Aos funcionários do SAME pela colaboração no levantamento de prontuários.

A todos os amigos que ajudaram a superar as horas de desânimo.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xii
Lista de Gráficos.....	xvii
Lista de Siglas.....	xviii
Resumo.....	xx
Summary.....	xxii
1	Introdução..... 1
2	Objetivos..... 7
3	Revisão da Literatura..... 9
3.1	Osteossarcoma..... 10
3.1.1	Epidemiologia..... 10
3.1.1.1	Incidência..... 11
3.1.1.2	Idade, sexo e raça..... 11
3.1.1.3	Sítio anatômico..... 12
3.1.1.4	Duração dos sintomas..... 14
3.1.2	Etiologia e Genética..... 14
3.1.2.1	Vírus..... 15
3.1.2.2	Agentes químicos..... 15
3.1.2.3	Radiação..... 16
3.1.2.4	Trauma..... 16
3.1.2.5	Lesões ósseas benignas..... 16
3.1.2.6	Doença de Paget..... 17
3.1.2.7	Fatores genéticos..... 18
3.1.2.8	Fatores hereditários..... 19
3.1.3	Patologia..... 22
3.1.3.1	Histologia..... 22
3.1.3.2	Classificação..... 25
3.1.4	Apresentação Clínica e Padrões de Disseminação..... 28

3.1.4.1	Quadro clínico.....	28
3.1.4.2	Disseminação.....	29
3.1.5	Avaliação Clínica e Diagnóstica.....	31
3.1.5.1	Avaliação radiológica do tumor primário.....	31
3.1.5.2	Avaliação radiológica das metástases.....	33
3.1.5.3	Estudos de Acompanhamento.....	33
3.1.5.4	Biópsia.....	34
3.1.5.5	Estadiamento.....	34
3.1.6	Fatores Prognósticos.....	36
3.1.6.1	Idade.....	37
3.1.6.2	Sexo.....	38
3.1.6.3	Localização anatômica do tumor.....	38
3.1.6.4	Tamanho do tumor.....	38
3.1.6.5	Resposta à quimioterapia pré-operatória (Grau de necrose tumoral).....	39
3.1.6.6	Metástase ao diagnóstico.....	40
3.1.6.7	Marcadores bioquímicos.....	42
3.1.6.8	Tipo histológico.....	43
3.1.6.9	Atraso diagnóstico.....	43
3.1.6.10	Fratura patológica.....	44
3.1.6.11	Vascularização tumoral.....	44
3.1.6.12	Marcadores moleculares.....	44
3.1.6.13	Tratamento.....	51
3.1.6.14	Outros.....	51
3.1.7	Tratamento.....	51
3.1.7.1	Quimioterapia.....	51
3.1.7.2	Cirurgia.....	61
3.1.7.3	Toracotomia.....	64
3.1.7.4	Radioterapia.....	65
3.1.7.5	Tratamento não cirúrgico de metástases pulmonares e extra-pulmonares.....	66
3.1.7.6	Outros tratamentos.....	66
3.2	Ezrin.....	71
3.2.1	Introdução.....	71

3.2.2	Definição.....	71
3.2.3	Função.....	71
3.2.4	Metastatização.....	72
3.2.5	Vias de expressão.....	74
3.2.6	Interação.....	75
3.2.7	Expressão.....	75
3.2.8	Introdução.....	77
3.2.9	Ezrin e outros tumores.....	78
3.2.10	Ezrin e Osteossarcoma.....	81
3.3	CD44.....	84
3.3.1	Introdução.....	84
3.3.2	Definição.....	84
3.3.3	Função.....	84
3.3.4	Metastatização.....	85
3.3.5	Vias de expressão.....	85
3.3.6	Interação.....	86
3.3.7	Expressão.....	86
3.3.8	CD44 e outros tumores.....	86
3.3.9	CD44 e Osteossarcoma.....	88
3.4	Complexo Ezrin-CD44.....	89
3.4.1	Introdução.....	89
3.4.2	Complexo Ezrin-CD44 e outros tumores.....	89
3.4.3	Complexo Ezrin-CD44 e Osteossarcoma.....	90
4	Casuística e Métodos.....	91
4.1	Estratégia da seleção dos pacientes.....	92
4.1.1	Caracterização dos pacientes, segundo variável sócio-demográfica.....	92
4.1.2	Caracterização dos pacientes, segundo variável clínica-laboratorial e de tratamento.....	93
4.1.3	Caracterização dos pacientes, segundo variável relacionada ao tumor.....	95
4.1.4	Caracterização dos pacientes, segundo variável relacionada à evolução.....	95

4.1.5	Associações entre características.....	97
4.1.5.1	Associação entre características do clínico, laboratorial e tratamento e características do tumor.....	98
4.1.5.2	Associação entre tamanho do tumor e tempo de queixa.....	98
4.1.5.3	Associação entre tamanho do tumor e presença de metástases.....	99
4.1.5.4	Associação entre presença de metástase e demais características clínico, laboratorial e tratamento.....	100
4.1.5.5	Associação entre presença de metástases e tempo de queixa.....	101
4.1.6	Análise de sobrevida.....	103
4.1.6.1	Sobrevida global pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo variáveis sócio-demográficas.....	103
4.1.6.2	Sobrevida global pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo características do tumor.....	103
4.1.6.3	Sobrevida global pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo variáveis clínico-laboratoriais e tratamento.....	104
4.2	Casuística analisada.....	105
4.2.1	Características sócio-demográficas.....	106
4.2.2	Variáveis relacionadas ao tumor.....	106
4.2.3	Variáveis clínica-laboratorial e de tratamento.....	107
4.2.4	Variáveis relacionadas à evolução dos pacientes.....	108
4.2.5	Análise de população estudada e população excluída.....	109
4.3	Métodos.....	109
4.3.1	Variáveis estudados para caracterização da população e para análise do objetivo.....	110
4.3.1.1	Dados epidemiológicos.....	110
4.3.1.2	Dados clínicos e laboratoriais.....	110
4.3.1.3	Extensão da doença.....	111
4.3.1.4	Tratamento.....	111
4.3.1.5	Evolução dos pacientes.....	112
4.3.1.6	Análise histológica.....	113
4.3.1.7	Construção das lâminas.....	114
4.3.1.8	Leitura e avaliação da imunoreatividade da proteína Ezrin de acordo com escala semiquantitativa, baseada nos seguintes critérios.....	115
4.3.1.9	Leitura da imunexpressão da proteína CD 44 conforme.....	116

4.3.2	Protocolo de Reações Imunoistoquímicas.....	116
4.3.3	Processamento e análise dos dados.....	117
4.3.3.1	Análise Estatística.....	117
4.3.3.2	Análise da Sobrevida.....	117
5	Análise de risco e aspectos éticos	120
6	Resultados.....	122
6.1	Análise dos casos segundo estudo imunoisquímico.....	122
6.1.1	Segundo variáveis relacionadas ao estudo imunoistoquímico Ezrin...	122
6.1.2	Segundo variáveis relacionadas ao estudo imunoistoquímico CD44..	125
6.1.3	Segundo variáveis relacionadas ao estudo do complexo ezrin-CD44.	127
6.2	Associação da imunorreatividade entre características sociodemográficas, clínico....etc.....	127
6.2.1	Associação entre características sócio-demográficas com imunorreatividade da proteína Ezrin.....	127
6.2.2	Associação entre características do tumor com imunorreatividade da proteína Ezrin.....	128
6.2.3	Associação entre características clínico-laboratorial e tratamento com imunorreatividade da proteína Ezrin.....	128
6.2.4	Associação entre características sócio-demográficas com imunorreatividade da proteína CD44.....	129
6.2.5	Associação entre características do tumor com imunorreatividade da proteína CD44.....	130
6.2.6	Associação entre características clínico-laboratorial e tratamento com imunorreatividade da proteína CD44.....	131
6.3	Sobrevida pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier.....	132
6.3.1	Segundo variáveis de imunorreatividade da proteína Ezrin.....	132
6.3.2	Sobrevida pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo interações de Ezrin com resposta histológica à quimioterapia em pacientes não metastáticos.....	133
6.3.3	Sobrevida pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo variáveis de imunorreatividade da proteína CD44.....	133

6.4	Curvas de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Méier.....	135
6.4.1	Sobrevida global.....	135
6.4.1.1	Sobrevida global para 34 pacientes.....	135
6.4.1.2	Sobrevida global segundo ezrin.....	136
6.4.1.3	Sobrevida global segundo CD44.....	137
6.5.1	Sobrevida livre de progressão.....	138
6.5.2	Sobrevida livre de doença para pacientes não metastáticos.....	140
7	Discussão.....	141
8	Conclusões.....	152
9	Anexos.....	154
	Anexo I Ficha cadastral.....	155
	Anexo II Protocolos.....	157
	Anexo III Ezrin.....	160
	Anexo IV Carta aprovação CEP.....	163
10	Referências.....	164

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição do osteossarcoma conforme faixa etária sítio de localização em série de 962 pacientes da Clínica Mayo.....	13
Figura 2	Fotomicrografias de lâmina de osteossarcoma convencional - HE 400x. (coloração Hematoxilina Eosina, aumento de 400 vezes).....	24
Figura 3	Fosforilação e ativação do Ezrin.....	74
Figura 4	Interação do Ezrin com receptores de superfície celular, adesão celular e mecanismo de transdução de sinal.....	77
Figura 5	Complexo Ezrin-CD44.....	89
Figura 6	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional com ezrin negativo (aumento 400 X).....	123
Figura 7	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional com ezrin positivo citoplasma (aumento 400 X).....	124
Figura 8	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional com ezrin positivo membrana (aumento 400 X).....	124
Figura 9	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional com CD44 positivo citoplasma (aumento 400 X).....	126
Figura 10	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional com CD44 positivo membrana (aumento 400 X).....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequência absoluta e relativa de 52 pacientes portadores de Osteossarcoma segundo variáveis sócio-demográficas. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	93
Tabela 2	Frequência absoluta e relativa de 52 pacientes portadores de osteossarcoma segundo variável clínica-laboratorial e de tratamento. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	94
Tabela 3	Frequência absoluta e relativa de 52 pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis relacionadas ao tumor. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.	95
Tabela 4	Frequência absoluta e relativa de 52 pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis relacionadas à evolução dos pacientes. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.	96
Tabela 5	Associação entre dados sócio-demográficos e tempo de queixa de 52 pacientes portadores de osteossarcoma. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	97
Tabela 6	Associação entre dados sócio-demográficos e presença de metástase de 52 pacientes portadores de osteossarcoma. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	97
Tabela 7	Associação entre tamanho do tumor e variáveis clínica-laboratoriais, de tratamento de 51 pacientes portadores de osteossarcoma. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	98
Tabela 8	Associação entre presença de metástase e demais características clínico, laboratorial e tratamento de 52 pacientes portadores de osteossarcoma. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	101

Tabela 9	Probabilidade de sobrevida global acumulada para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variável sócio-demográfica. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	103
Tabela 10	Probabilidade de sobrevida global acumulada para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo características do tumor. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	104
Tabela 11	Probabilidade de sobrevida global acumulada para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis clínico-laboratorial e tratamento. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	105
Tabela 12	Descrição das características sócio-demográficas dos pacientes avaliados no estudo imunoistoquímico e dos pacientes excluídos. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	106
Tabela 13	Descrição das características do tumor dos pacientes avaliados no estudo imunoistoquímico e dos pacientes excluídos. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	107
Tabela 14	Descrição das características clínico-laboratoriais e tratamento dos pacientes avaliados no estudo imunoistoquímico e dos pacientes excluídos. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	108
Tabela 15	Descrição da evolução dos pacientes avaliados no estudo imunoistoquímico e dos pacientes excluídos. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	109
Tabela 16	Frequência absoluta e relativa de 34 pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis relacionadas a estudo imunoistoquímico Ezrin. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	123

Tabela 17	Frequência absoluta e relativa de 34 pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis relacionadas a estudo imunoistoquímico CD44. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	125
Tabela 18	Associação entre imunorreatividade de ezrin e CD44. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	127
Tabela 19	Associação entre as variáveis sócio-demográficas com imunorreatividade da proteína Ezrin. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	127
Tabela 20	Associação entre as características do tumor com imunorreatividade da proteína Ezrin. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	128
Tabela 21	Associação entre as variáveis clínico-laboratoriais e tratamento com imunorreatividade da proteína Ezrin. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	129
Tabela 22	Associação entre as variáveis sócio-demográficas com imunorreatividade da proteína CD44. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	130
Tabela 23	Associação entre as características do tumor com imunorreatividade da proteína CD44. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	130
Tabela 24	Associação entre as variáveis clínico-laboratorial e tratamento com imunorreatividade da proteína CD44. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	131
Tabela 25	Probabilidade de sobrevida global acumulada para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis de imunorreatividade da proteína Ezrin. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	132
Tabela 26	Sobrevida livre de doença pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo interações de Ezrin com resposta histológica à quimioterapia em pacientes não metastáticos.....	133

Tabela 27	Probabilidade de sobrevida global acumulada para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis de imunorreatividade da proteína CD44. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.	134
Tabela 28	Probabilidade de sobrevida livre de progressão para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis de imunorreatividade da proteína Ezrin. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	134
Tabela 29	Probabilidade de sobrevida livre de progressão para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis de imunorreatividade da proteína CD44. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	135
Tabela 30	Probabilidade de sobrevida livre de progressão para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis de imunorreatividade do complexo Ezrin-CD44. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.....	135

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Correlação entre as médias do tamanho do tumor e tempo de queixa em meses.....	99
Gráfico 2	Correlação entre a média da presença de metástase e tamanho do tumor.....	100
Gráfico 3	Correlação entre a média da presença de metástase e tempo de queixa em meses.....	102
Gráfico 4	Curvas de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Méier segundo sobrevida global para os pacientes estudados através de imunoistoquímica.....	136
Gráfico 5	Curvas de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo imunorreatividade de Ezrin.....	137
Gráfico 6	Curvas de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Méier segundo imunorreatividade de CD44.....	138
Gráfico 7	Curva de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Méier segundo sobrevida livre de progressão.....	139
Gráfico 8	Curva de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Méier segundo sobrevida livre de doença para os 21 pacientes não metastáticos.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CCG	Children Cancer Group
CEC	carcinoma espinho celular
CIVD	coagulação intravascular disseminada
COSS	Cooperative Osteosarcoma Study Group
DHL	Desidrogenase Láctica
Falc	Fosfatase alcalina
FDG PET	FluoroDeoxyGlucose Positron Emission Tomography scan
FLT 18F	Fluortimidina
GBTO	Grupo Brasileiro de Tratamento de Osteossarcoma
GMCSF	Fator estimulante de colônia granulócito-monócito
H-CAM	Homing Cellular Adhesion Molecule
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HE	Hematoxilina Eosina
IL2	Interleucina 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
MIOS	Multi Institutional Osteosarcoma Study
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
MSTS	MusculoSkeletal Tumor Society
MTP-PE	Muramyl TriPeptide Phosphatidyl Ethanolamine
MTX	Metotrexate
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	osteossarcoma
PET CT	Positron Emission Tomography scan
Pgp	glicoproteína P
PNET	Tumor Neuro Ectodérmico Primitivo
POG	Pediatric Oncology Group

RB	retinoblastoma
RFC	Carregador Folato Reduzido
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results Program
SFOP	Sociedade Francesa de Oncologia Pediátrica
SG	Sobrevida Global
SLE	Sobrevida Livre de Eventos
SLR	Sobrevida Livre de Recaída
SPSS	Statistical Package for Social Science
TESS	Toronto Extremity Salvage Score
TMA	Tissue MicroArray
UICC	International Union against Cancer

RESUMO

Boldrini E. *Estudo da associação das variáveis clínico-patológicas com a expressão imunoistoquímica de Ezrin e CD44 em pacientes portadores de Osteossarcoma*. [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 204p.

Metástase é o fator prognóstico mais importante em pacientes com osteossarcoma. A identificação de genes que são cruciais para disseminação metastática é de grande interesse não só para o entendimento básico dos processos moleculares e celulares envolvidos, mas também por prover um potencial de novos alvos terapêuticos. No osteossarcoma tem sido relatado que o gene *Ezrin*, membro da família ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) é importante para que ocorra metástase. Consiste em um componente do citoesqueleto que tem sido responsável por muitas funções, como, por exemplo, como condutor de sinais entre superfície celular associada à metástase e tradução do sinal. Isto sugere que o gene *Ezrin* têm a chave da coordenação de sinais e do complexo celular que são necessários para o sucesso da ocorrência de metástases. CD44 é conhecida como a primeira proteína de superfície que demonstrou interação com as proteínas do complexo ERM. Formam um complexo que exerce diversos papéis em células normais e particularmente nas células do câncer. Aumento na expressão de CD44 potencialmente leva a um aumento funcional da ativação do *Ezrin* e tem sido correlacionada com aumento da invasão do osteossarcoma. **Objetivo:** A proposta deste estudo é correlacionar a expressão da proteína Ezrin e CD44 com fatores clínicos, identificar fatores prognósticos, sugerindo uma estratificação dos pacientes de risco, para que possa ser proposta no futuro uma terapêutica mais efetiva e com menor toxicidade. **Casuística e Métodos:** Foram revistos 52 pacientes com osteossarcoma tratados no Hospital de Câncer de Barretos entre 2000 e 2005. O tumor ósseo é uma das neoplasias sólidas mais frequentes em nossa Instituição, representando aproximadamente 15% dos casos novos/ano. Devido a algumas particularidades, como atendimentos de pacientes em âmbito nacional, tivemos 46,2 % de pacientes metastáticos ao diagnóstico, 37,3 % de tumores maiores que 15 cm, 30,2 % de amputações e 11,5 % de recaídas locais em cirurgias conservadoras. Não demonstramos associação da duração dos sintomas com o tamanho do tumor, presença de metástases. O nível de expressão da proteína Ezrin e CD44H foi avaliado por

imunoistoquímica na biópsia inicial em 34 amostras. O nível de expressão pela coloração imunoistoquímica foi classificada em 1+ (1 - 25%), 2+ (26 - 50%), 3+ (51 - 75%), 4+ (76 - 100%) para a proteína Ezrin e o CD44 foi classificada como negativa (até 10%), 1+ (até 50%) e 2+ (até 100%). Foi realizado um escore para classificar a expressão do Ezrin em baixa e alta expressão (levando em consideração a intensidade e a proporção de células coradas) e interação da expressão de ezrin com grau de responsividade à quimioterapia. A associação entre as variáveis foi realizada usando o teste de qui-quadrado. O cálculo dos estimadores da probabilidade de sobrevida foi realizado pelo técnica de Kaplan-Meier e as comparações entre as curvas foi realizado pelo teste de *log rank*. **Resultados:** A imunoreatividade da proteína Ezrin foi detectada na maioria dos pacientes com osteossarcoma (76%), com igual distribuição em citoplasma e membrana (38,2%). Quanto à intensidade de coloração, tivemos 58,9% forte. Na escala semiquantitativa metade dos casos apresentou mais de 50% das células coradas. No escore que associa intensidade de coloração e proporção de células coradas tivemos 50,0% com alta expressão. Cinquenta por cento dos pacientes apresentaram CD44H positivo, sendo predominante no citoplasma (38,2%). Na escala semiquantitativa 20,6 % apresentava coloração em mais de 50% das células. Ambos os marcadores não mostraram associação a nenhuma variável clínico-patológicas estudada. Entre os pacientes que apresentaram imunoreatividade de ezrin positivos a taxa de sobrevida apresentada em 5 anos foi de 12,8% versus com 41,7% dos pacientes com ezrin negativo.(p = 0,121). O escore realizado com a imunoreatividade de ezrin também não mostrou papel na sobrevida (p: 0,558). Já a interação da positividade de Ezrin com má resposta histológica para pacientes não metastáticos mostrou associação com sobrevida livre de recaída em 5 anos (100% x 12,7%; p: 0,042). Quanto à taxa de sobrevida global foi semelhante para pacientes com CD44 positivo (21,5%) ou negativo (25,3%) (p: 0,676). **Conclusão:** Em nossa experiência, a imunoexpressão de CD44H nem Ezrin mostraram ser preditor do prognóstico em pacientes com osteossarcoma. Os resultados sugerem que são necessárias outras investigações para melhor definir a relação entre padrão de expressão de Ezrin e CD44, status funcional e sobrevida em portadores de osteossarcoma.

Palavra-chave: Osteossarcoma. Metástase neoplásica. Imunoistoquímica. Prognóstico

SUMMARY

Boldrini E. *Association between clinicopathological variables and the immunohistochemical expression of Ezrin and CD44 in patients with osteosarcoma.* [Dissertation] São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 204p.

Metastasis is the most important prognostic factor in patients with osteosarcoma. Identification of genes that are crucial for metastatic dissemination is of great interest, not only to gain a basic understanding of the molecular and cellular processes involved, but also to provide the potential for new therapeutic targets. In relation to osteosarcoma, it has been reported that the *Ezrin* gene, a member of the ERM family (ezrin-radixin-moesin), is important for enabling metastasis. *Ezrin* is a component of the cytoskeleton that has been implicated in many functions, for example as a conductor of signals between cell surfaces associated with metastasis and signal translation. This suggests that *Ezrin* holds the key to coordination of the signals and cell complexes needed for successful metastasis to occur. CD44 is known as the first surface protein that was shown to interact with proteins of the ERM complex. It forms a complex that plays various roles in normal cells and particularly in cancer cells. Increased CD44 expression potentially leads to functional increases in *Ezrin* activation and has been correlated with greater osteosarcoma invasion. **Objective:** The aim of this study was to correlate the expression of the Ezrin and CD44 proteins with clinical factors and identify prognostic factors, thereby enabling stratification of patients at risk, so that therapy of greater effectiveness and lower toxicity can be proposed in the future. **Sample and Methods:** Data on 52 patients with osteosarcoma who were treated at Barretos Cancer Hospital between 2000 and 2005 were reviewed. Bone tumors are among the types of solid neoplasia most frequently seen in our institution, accounting for around 15% of the new cases every year. Because of certain special features such as our institution’s national-level attendance, 46.2% of the patients were metastatic at diagnosis, 37.3% of the tumors were larger than 15 cm, 30.2% of the cases led to amputation and 11.5% of the conservatively operated cases presented local relapse. We did not find any association between symptoms and either tumor size or presence of metastases. The expression levels of the Ezrin and CD44H proteins were evaluated using immunohistochemistry on the initial biopsy, for 34 samples. From the

immunohistochemical staining, the Ezrin protein expression level was classified as 1+ (1 - 25%), 2+ (26 - 50%), 3+ (51 - 75%) or 4+ (76 - 100%). CD44 was classified as negative (up to 10%), 1+ (up to 50%) or 2+ (up to 100%). The Ezrin expression was scored to classify it as low or high (considering the intensity and proportion of stained cells) and the interaction of Ezrin expression with the degree of responsiveness to chemotherapy. The chi-square test was used to correlate the variables. Estimators for survival likelihood were calculated using the Kaplan-Meier technique and the curves were compared using the log-rank test. **Results:** Most patients with osteosarcoma (76%) were immunoreactive for Ezrin protein, equally distributed between cytoplasm and membrane (38.2%). High-intensity staining was found in 58.9%. On the semiquantitative scale, half of the cases presented more than 50% of the cells stained. From the score correlating staining intensity and proportion of cells stained, 50.0% showed high expression. Half of the patients were positive for CD44H, predominantly in cytoplasm (38.2%). On the semiquantitative scale, 20.6% presented staining in more than 50% of the cells. Neither of the markers showed associations with any of the clinicopathological variables studied. Among the patients who were immunoreactive for Ezrin, the five-year survival rate was 12.8%, while it was 41.7% among Ezrin-negative patients ($p = 0.121$). The score relating to Ezrin immunoreactivity was not shown to have a role in survival ($p = 0.558$). However, the interaction between Ezrin-positive findings and poor histological response among non-metastatic patients showed an association with five-year relapse-free survival (100% x 12.7%; $p = 0.042$). The overall survival rates for CD44-positive and negative patients were similar (21.5% and 25.3%, respectively) ($p = 0.676$). **Conclusion:** In our experience, neither CD44H nor Ezrin immunoexpression predicted the prognosis for patients with osteosarcoma. The results suggest that further investigations are needed in order to better define the relationships between Ezrin and CD44 expression patterns, functional status and survival among patients with osteosarcoma.

Key words: Osteosarcoma. Metastasis. Imunoistochemistry. Prognostic

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer infanto-juvenil (abaixo de 19 anos) é considerado raro quando comparado com os tumores do adulto, correspondendo entre 2 e 3% de todos os tumores malignos. Estimativa realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o Brasil, no ano de 2010, ocorrerão 375.420 casos novos de câncer, à exceção dos tumores de pele não melanoma. Como o percentual mediano dos tumores pediátricos observados nos RCBP brasileiros encontra-se próximo de 2,5%, depreende-se, portanto, que ocorrerão cerca de 9.386 casos novos de câncer em crianças e adolescentes até os 18 anos. (Ministério da Saúde, 2009). No Brasil, são diagnosticados, por ano, 13 mil novos casos de câncer em pacientes com até 21 anos. Cerca de sete mil casos são registrados em crianças até 12 anos de idade.

Os tumores mais comuns que podem ocorrer na infância são as leucemias, linfomas, tumores do sistema nervoso, sarcomas, sendo o osteossarcoma o sexto mais comum em crianças e o terceiro em adolescentes (Bleyer, 1997).

A partir dos cinco anos de idade, excetuando-se as causas externas e mal definidas, os óbitos por câncer correspondem à primeira causa de morte (Ministério da Saúde, 2007).

O tumor ósseo pode ser primitivo do osso ou metastático, isto é, vindo de outros órgãos. Esses últimos são mais freqüentes e, comumente, oriundos da próstata, mama, tireóide, pulmão e rim.

O câncer ósseo primário é pouco freqüente. Sabemos que tumores primários do sistema esquelético correspondem a 0,2% de todos os cânceres (Jemal et al., 2004). Mesmo assim, surgem no Brasil, aproximadamente, 2.700 casos novos por ano. Metade dos tumores ósseos da infância são malignos e destes o osteossarcoma é

o mais freqüente, acometendo 35% de todos os tumores ósseos primários (Unni, 1996). Juntamente com osteossarcoma, o sarcoma de Ewing e o condrossarcoma são os tipos mais freqüentes.

Dentre esses tumores, o osteossarcoma representa 5% dos cânceres que ocorrem na criança (Little, 1999), mas pode acometer todos os grupos etários, geralmente tem distribuição bimodal; 75% ocorrem em pacientes menores que 20 anos e pequeno número em idosos (Rosemberg, 2005).

Nas últimas três décadas, um notável progresso tem sido feito no entendimento da biologia e etiologia dos tumores pediátricos. A chance de cura em crianças acometidas pelo câncer, se diagnosticadas precocemente e tratadas em centros especializados, é alta. A maioria dos pacientes portadores de tumores pediátricos e sem metástases podem ser curados devido o desenvolvimento de terapia adjuvante efetiva, avanços cirúrgicos e do diagnóstico por imagem, o que têm permitido aumento na qualidade de vida dos sobreviventes.

A participação das instituições em estudos nacionais e internacionais, nos EUA e Europa, levou-as a desenvolverem critérios uniformes para o diagnóstico, tratamento, avaliação de resultados e a obtenção de conhecimentos que permitiram as abordagens multidisciplinares.

Apesar de raro, o osteossarcoma merece atenção especial porque ocorre em crianças, adolescentes e adultos jovens, inclui habitualmente tratamento mutilante e tem alta mortalidade ainda nos dias atuais, sendo que apenas 20-30% dos pacientes metastáticos se curam.

As metástases consistem na principal causa de morte associada ao câncer. O insidioso processo de metastização é o aspecto mais devastador e menos entendido no câncer. A identificação da chave reguladora de metástase é crucial para o entendimento da disseminação tumoral e desenvolvimento de novas intervenções.

Fatores anátomo-patológicos e clínicos são em geral insuficientes para prever a evolução e resposta tumoral. Até hoje, não existem fatores genéticos ou moleculares que possam ser rotineiramente usados para estratificar pacientes em alto ou baixo risco de metástases (Salas et al., 2007).

A metástase é um processo extremamente complexo. Para que ocorram as metástases, as células tumorais têm de enfrentar uma série de desafios, como escapar do tumor primário, invadir tecidos adjacentes, extravasar no sistema vascular, linfático ou espaço peritoneal, prevenir-se de “*anoikis*”, que é a apoptose induzida, permanecer num sítio distante, invadir um novo ambiente, não responder ao processo imune e proliferar em um novo micro-ambiente (Hunter, 2004).

Quando o atraso no diagnóstico impacta no prognóstico? O atraso no diagnóstico dá tempo para o tumor produzir metástases? O senso comum sugere que se o tumor crescer por longo tempo é mais comum espalhar e mais difícil curar. Contudo, evidências científicas mostram que isso não é absoluto e confirmam que o tempo dos sintomas ao diagnóstico não está necessariamente relacionado com a presença de metástases.

A identificação de genes que são cruciais para disseminação metastática é de grande interesse não só para o entendimento básico dos processos moleculares e celulares envolvidos, mas também por prover um potencial de novos alvos terapêuticos.

Investigadores do *National Cancer Institute* (NCI) estudaram linhagens de células de osteossarcoma de camundongos. Embora todas as linhagens desenvolvessem tumores primários, somente algumas eram eficientes para produzir metástases pulmonares. Estudos genéticos compararam esses dois tipos de células e encontraram uma molécula de particular interesse – ezrin – que é altamente expresso em linhagens metastáticas. Inibindo o ezrin consegue-se converter a linhagem para

baixo potencial metastático, mas essa linhagem mantém a capacidade de desenvolver tumor primário.

No osteossarcoma tem sido reportado que o *Ezrin* é necessário para metástase no modelo animal. Altas expressões de *Ezrin*, em tumores caninos, estão associadas ao desenvolvimento precoce de metástases. Ezrin é um componente do citoesqueleto e ajuda a célula tumoral a sobreviver no ambiente do pulmão que difere substancialmente do osso, onde é originado (Khanna et al., 2004).

Isso pode ser extrapolado para pacientes com câncer, não só pediátrico como adulto também (Hunter, 2004; Park et al., 2006). Crianças diagnosticadas com osteossarcoma não metastático com altos níveis de Ezrin têm taxas de recorrência mais rápida quando comparados com aqueles com baixos níveis de Ezrin.

Estudo semelhante foi realizado em camundongos com rabdomiossarcoma embrionário. Embora apresentando linhagens celulares geneticamente idênticas, as com alto potencial metastático tem “assinatura” diferente. Ezrin está entre os genes superexpressos nas linhagens com alto potencial metastático comparado com aquelas com baixo potencial (Yu et al., 2004).

A recente identificação do gene *Ezrin* como um possível componente nas metástases de sarcomas ósseos e musculares humanos é um importante avanço, sugere que exista uma função pró-metástase na progressão do tumor e na metástase. O gene *Ezrin* tem sido implicado em muitas funções, como, por exemplo, como condutor de sinais entre superfície celular associada à metástase e tradução do sinal. Isto sugere que o gene *Ezrin* e potencialmente outros membros da família ERM (Ezrin-Radixin-Moesin) têm a chave da coordenação de sinais e do complexo celular que são necessários para o sucesso da ocorrência de metástases. Khanna et al. (2004) reportaram que quando o tumor apresentava expressão da proteína ezrin estava relacionado a pior prognóstico em pacientes pediátricos.

CD44 é conhecida por ter sido a primeira proteína de superfície que foi demonstrado interação com as proteínas do complexo ERM. Forma um complexo que exerce diversos papéis em células normais e particularmente nas células do câncer. Aumento na expressão de CD44 potencialmente leva a um aumento funcional da ativação do Ezrin e tem sido correlacionada com aumento da invasão do osteossarcoma (Martin et al., 2003).

A proposta deste estudo é correlacionar fatores imunoistoquímicos da proteína Ezrin e CD44 com fatores clínicos, identificar fatores prognósticos, sugerindo uma estratificação dos pacientes de risco, para que possa ser proposta no futuro uma terapêutica mais efetiva e com menor toxicidade.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1. Descrever o padrão de imunorreatividade dos marcadores imunoistoquímicos Ezrin e CD44 nas biópsias de pacientes portadores de osteossarcoma, sem tratamento prévio;
2. Associar a imunoexpressão da proteína Ezrin e CD44 com fatores clínicos, demográficos, anátomo-patológicos, resposta à quimioterapia e presença de metástases ao diagnóstico;
3. Analisar a sobrevida global e livre de evento ou doença em pacientes portadores de osteossarcoma, segundo características demográficas, clínicas, anátomo-patológicos, de tratamento e imunoexpressão Ezrin e CD44;
4. Determinar se a expressão das proteínas estudadas é fator prognóstico.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 OSTEOSSARCOMA

3.1.1 Epidemiologia

O osteossarcoma também denominado sarcoma osteogênico ou tumor mesenquimal maligno é o tumor ósseo maligno primário mais comum em crianças e adolescentes, com pico de incidência entre a segunda e terceira décadas de vida. Foi descrito pela primeira vez em 1879 por Samuel Weissel Gross (Gross, 1975).

Antes de 1970 os resultados eram desanimadores, devido à história natural da doença, que apresentava taxas de cura muito baixas mesmo em pacientes com doença localizada e com ausência de metástase. O paciente era tratado agressivamente com amputação do membro afetado e, mesmo assim, desenvolvia recorrência pulmonar e em poucos meses evoluía ao óbito (Tanaka et al., 1997). Provavelmente essas metástases não eram evidenciadas com os exames realizados da época. Baseado nestas observações supõe-se a presença de micrometástases já ao diagnóstico.

Com a evolução dos quimioterápicos novas perspectivas abriram-se. Na era pré quimioterapia, a sobrevida livre de doença era de aproximadamente 20%. Com os avanços das técnicas de imagem, cirurgia e especialmente combinação de dois agentes quimioterápicos (Adriamicina e altas doses de Methotrexate), a taxa de sobrevida desses pacientes aumentou para 40-60%. Infelizmente contudo parece que essa taxa alcançou um platô (Holland et al., 1997), permanecendo um desafio o aumento da sobrevida.

3.1.1.1 Incidência

No Brasil temos uma população de 169 milhões de pessoas, sendo 49 milhões abaixo de 15 anos de idade e 16 milhões entre 15 e 19 anos (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 2000).

Sabemos que tumores primários do sistema esquelético são raros e correspondem a 0,2% de todos os cânceres (Jemal et al., 2004). O osteossarcoma corresponde a 5% das doenças malignas entre crianças e adolescentes, podendo acometer todos os grupos etários, mas geralmente tem distribuição bimodal, em pacientes menores que 20 anos e em idosos (Rosemberg, 2005).

Nos EUA a taxa anual é de aproximadamente 8,7 casos/ milhão de crianças e adolescentes menores de 20 anos (Surveillance, Epidemiology, and end Results Program SEER, 2009). No Brasil, face à dificuldade de se obter o registro dos casos em todo o país estima-se 350 casos/ ano até 20 anos (IBGE, 2000).

Ocorre também naturalmente em cães, com aspectos semelhantes aos dos humanos como histologia, genética, alvos moleculares, comportamento biológico e resposta à terapias convencionais, auxiliando a um maior entendimento da biologia.

3.1.1.2 Idade, sexo e raça.

Pode acometer todos os grupos etários, sendo 75% em menores de 20 anos (durante o crescimento ósseo rápido) e o restante em idosos, geralmente com condições pré-existentes como doença de Paget, radioterapia (Parkin et al., 1993; Rosemberg, 2005).

Acomete mais o sexo masculino (1,4-1,6: 1,0) (Rosemberg, 2005) e não tem diferença entre raças (branca e negra), porém com tendência a pico de incidência na raça branca e em menores de 20 anos (Czerniak, 1998).

Essa incidência coincide com a fase de crescimento intenso da adolescência.

Diversos fatores são citados para apoiar esta relação:

- portadores de osteossarcoma são mais altos que seus equivalentes em idade;
- em meninas ocorre em idades mais precoces do que em meninos, correspondendo à idade que ocorre o crescimento acelerado no sexo feminino;
- tumores do úmero tendem a ocorrer em idades mais precoces do que tumores do fêmur e tíbia correlacionando-se ao desenvolvimento mais precoce do crescimento do úmero.

Esses fatos levavam a especulação que tumores ósseos apareciam a partir de uma aberração do processo normal de crescimento e estruturação. Células com proliferação rápida seriam particularmente susceptíveis a agentes oncogênicos, erros mitóticos ou outros acontecimentos que levariam a transformação neoplásica (Fraumeni, 1967).

3.1.1.3 Sítio anatômico

Em pacientes jovens, as lesões localizam-se 50% ao redor do joelho e 90% dos casos são metafisárias em ossos longos, mais frequentemente fêmur distal, tíbia proximal e úmero proximal, conforme ilustrado na Figura 1.

Em maiores de 50 anos as lesões acometem em 40% das vezes os ossos chatos (Rosemberg, 2005). O esqueleto axial ou ossos crânio-faciais são comprometidos em pacientes mais velhos. É raro no antebraço, ossos das mãos, pés e mandíbula (Huvos, 1991).

Fonte: Unni (1996).

Figura 1 – Distribuição do osteossarcoma conforme faixa etária e sítio de localização em série de 962 pacientes da Clínica Mayo.

3.1.1.4 Duração dos sintomas

O atraso diagnóstico continua sendo um fator importante. Avaliando variáveis sócio-demográficas, clínicas e sócioeconômicas e relacionando-as com a história da doença, verifica-se que o atraso é multifatorial e diferente para cada tipo de câncer. Os adolescentes apresentam o maior intervalo de tempo, sugerindo um diagnóstico tardio, provavelmente com doença mais avançada (Rodrigues e de Camargo, 2003).

Em nosso meio, muitos pacientes ainda são encaminhados ao centro de tratamento com doenças em estágio avançado.

Martin et al. (2007) publicaram um levantamento realizado em serviços públicos e privados americanos no período de 2001-2003 com 207 pacientes com câncer, idade variando de 15 a 29 anos, onde o tempo para o diagnóstico foi de 13,1 semanas.

3.1.2 Etiologia e Genética

A etiologia é desconhecida. Vários aspectos da carcinogênese têm sido enfocados para esclarecer e proporcionar melhor entendimento.

O processo de carcinogênese divide-se em três etapas básicas, que são iniciação, promoção e progressão. Na primeira etapa, sob ação de agentes mutagênicos, a célula acumula alterações no seu material genético. Na segunda fase sofre ação de agentes promotores que induzem o crescimento dessa célula mutada, promovendo sua expansão clonal. Na terceira etapa ocorre a progressão tumoral, que corresponde a capacidade desse clone de células transformadas invadir e metastatizar (Miller, 1976).

A maioria dos osteossarcomas são esporádicos, contudo um pequeno número de casos resulta de predisposição herdada devido síndrome genética que são

associadas com mutações constitucionais nos genes envolvidos no controle do ciclo celular ou no metabolismo do DNA.

A proliferação rápida das células pode ser particularmente susceptível a agentes oncogênicos e erros mitóticos. Aberrações genéticas tem sido reconhecidas, assim como cariótipos complexos. A grande maioria dos casos aparentemente aparece espontaneamente.

Fatores etiológicos ou iniciadores são discutidos abaixo, como:

3.1.2.1 Vírus

Vírus tem sido sugerido, contudo não há dados que demonstrem que esses agentes infecciosos sejam causadores, e nem evidências que suportem essa relação causal. FBV é o único agente viral isolado de sarcoma espontâneo (Fuchs e Pritchard, 2002) e é conhecido por ser um potente indutor de osteossarcoma em camundongos (Finkel et al., 1966).

3.1.2.2 Agentes químicos

Agentes químicos como o metilcolantreno, óxido de berílio e silicato de berílio zinco são gatilhos para alterações genéticas que induzem o osteossarcoma em coelhos (Peterson et al., 1964). Uso de Thorotrast® e radium intravenoso têm sido associados ao aparecimento de osteossarcoma, assim como exposição a agentes alquilantes que contribui para o desenvolvimento de tumores ósseos independente de radioterapia (Newton et al., 1991).

3.1.2.3 Radiação

O único agente ambiental comprovado como fator etiológico do osteossarcoma é a radiação ionizante. Está implicada em 3% dos casos, o período mínimo entre a exposição e o aparecimento do tumor é de 4 anos com aparecimento médio de 15 anos (Varela-Duran e Dehner, 1980), sendo que a dose mínima não é bem estabelecida.

Um aumento da incidência tem sido confirmado à medida que mais pacientes sobrevivem tempo suficiente após a irradiação primária para desenvolver este segundo tumor.

3.1.2.4 Trauma

Antecedentes de trauma têm sido associados com o desenvolvimento de tumores ósseos, mas há mínimas evidências que apoiam essa relação causal. Na verdade, o trauma com frequência leva o paciente a procurar o médico e o estudo radiológico revela a neoplasia ou fratura patológica.

3.1.2.5 Lesões ósseas benignas

Lesões ósseas benignas como doença de Ollier ou encondromatose múltipla que é um defeito não hereditário, osteocondroma solitário ou múltiplo, exostose hereditária múltipla, infartos ósseos, displasia fibrosa com radioterapia prévia e osteomielite crônica, sítios de infartos ósseos têm sido relatados como fatores esporádicos predisponentes ao osteossarcoma (Unni e Dahlin, 1979; Huvos, 1991; Czerniak, 1998).

3.1.2.6 Doença de Paget

A doença de Paget é um distúrbio crônico do esqueleto, no qual alguns ossos apresentam um crescimento anormal, aumentam de tamanho e tornam-se mais frágeis. O distúrbio pode afetar qualquer osso, mas mais comumente os ossos da pelve, o fêmur, os ossos do crânio, a tíbia, vértebras, as clavículas e o úmero. O sexo masculino apresenta uma probabilidade 50% maior de apresentar a doença de Paget do que o sexo feminino.

Em condições normais, osteoclastos e osteoblastos trabalham em equilíbrio para manter a estrutura e a integridade óssea. No caso da doença de Paget, tanto os osteoclastos quanto osteoblastos tornam-se hiperativos em algumas áreas dos ossos e a velocidade de renovação dessas áreas aumenta de modo significativo.

A causa da doença de Paget é desconhecida. Apesar de apresentar uma tendência a ocorrer em família, até o momento não foi descoberto qualquer padrão genético específico. A mutação no gene *SQSTM1*, que alguns pacientes carregam, pode estar relacionada com a formação do osteossarcoma, contudo não há evidências que mostrem que essa relação é verdadeira (Hansen, 2002).

O osteossarcoma tem sido reportado em portadores de doença de Paget (5%), relação ainda não bem entendida, principalmente em pacientes com mais de 40 anos. Não está necessariamente relacionado à extensão do envolvimento do esqueleto pela doença, e é histologicamente indistinguível do osteossarcoma convencional, porém tem prognóstico mais sombrio (Huvos, 1979).

3.1.2.7 Fatores genéticos

Existem relatos de famílias nas quais vários membros desenvolvem osteossarcoma, sugerindo uma predisposição genética, no entanto identificam-se duas formas de osteossarcoma familiar: esporádica e hereditária.

O retinoblastoma hereditário foi a primeira síndrome genética que mostrou aumento do risco de desenvolver osteossarcoma. Retinoblastoma é um tumor maligno da retina que se desenvolve na primeira infância. Inicialmente parecia representar uma complicação da radioterapia, no entanto, a relação existe independente do paciente ter recebido radioterapia ou não e muitos desenvolveram osteossarcoma secundário em extremidades, ou seja em locais distantes da zona irradiada. Envolve mutações no gene *RB*, que é um gene supressor. Compartilha a deleção no cromossomo 13 (13q14). Este gene pertence a uma família extensa cuja ausência ou anomalia facilita a gênese e crescimento de tumor na retina e osteossarcoma (Hansen et al., 1985). Pessoas com mutação do gene *RB* na linhagem germinativa que desenvolveram retinoblastoma têm um risco aumentado de desenvolver segunda neoplasia, sendo o de desenvolver osteossarcoma em torno de 30% (Wang et al., 2005) e um risco 100 vezes maior de desenvolvimento do osteossarcoma em relação à população normal (Pritchard et al., 1975).

Um segundo oncogene recessivo implicado na etiologia e progressão do osteossarcoma é o *p53*. O produto do gene *p53* é crítico na manutenção da integridade do genoma. Em células normais, o dano do DNA resulta em acúmulo de *p53* que desliga a replicação para permitir a reparação. Se o reparo do dano do DNA não tem sucesso, o *p53* pode disparar a apoptose, induzindo a morte celular. Células com *p53* mutado ou inativo não respondem apropriadamente aos agentes de danos do DNA, levando à transformação maligna (Hansen et al., 1999). Várias evidências

implicam a importância do papel do *p53* no osteossarcoma. Mutações desse gene são detectadas em 25% dos casos de osteossarcoma (Toguchida et al., 1992).

O osteossarcoma também aparece como parte de outra síndrome de câncer familiar que afeta membros que são afligidos por câncer de mama, sarcoma de partes moles, tumores cerebrais, leucemia, carcinoma da cortical adrenal e osteossarcoma. Chamada de síndrome de Li-Fraumeni é uma síndrome com caráter autossômico dominante, de alta penetrância, onde os pacientes são portadores de mutação do gene *TP53*, herdado em linhagem germinativa no cromossomo 17p13.1. Membros afetados tem risco projetado de desenvolver câncer em torno de 50% aos 30 anos e mais de 90% aos 70 anos. (Malkin et al., 1990).

Três critérios devem estar presentes para diagnóstico da síndrome de Li Fraumeni:

1. Ser portador de sarcoma antes dos 45 anos;
2. Ter um parente de primeiro grau com qualquer tipo de câncer diagnosticado antes dos 45 anos;
3. Outro parente, de primeiro ou segundo grau, com câncer diagnosticado antes dos 45 anos ou diagnóstico de sarcoma em qualquer idade, (Li e Fraumeni 1982).

Apesar de essa mutação ser muito frequente em osteossarcomas esporádicos, a associação com a síndrome é pequena, em torno de 3% (Mcintyre et al., 1994).

3.1.2.8 Fatores hereditários

Existe descrição de síndromes hereditárias relacionadas com o desenvolvimento do osteossarcoma (Fuchs e Pritchard, 2002). Na categoria

desordem da RECQ helicase temos 5 síndromes, sendo 3 ligadas à predisposição ao câncer:

1. Síndrome de Rothmund-Thompson ou poikiloderma congênita que é uma síndrome autossômica recessiva, que ocorre principalmente no sexo feminino, caracterizada pela presença de placas cutâneas teleangiectásicas, hiperpigmentadas, atróficas, reticuladas, em geral acompanhadas de catarata juvenil, nariz selado, defeitos congênitos ósseos, distúrbios no crescimento do cabelo, unhas e dentes e hipogonadismo. O risco de desenvolver osteossarcoma é aproximadamente 30%. Os pacientes apresentam-se com média de idade de 9 anos, que é mais baixa que a população em geral. Dois terços dos pacientes têm perda de função truncada na mutação no gene RECQL4, e são esses pacientes que têm risco de desenvolver osteossarcoma (Wang et al., 2003).

2. Síndrome de Bloom que é uma doença autossômica recessiva rara, caracterizada por fotossensibilidade, retardo de crescimento, hipogonadismo, imunodeficiência. É causada por mutação no gene *BLM* (15q26.1), que codifica a proteína DNA helicase, essencial à manutenção da estabilidade cromossômica e que predispõe os pacientes a todos os tipos de câncer em altas taxas (German, 1993).

3. Síndrome de Werner que é uma doença autossômica recessiva muito rara, também conhecida como progéria do adulto. O defeito no gene *WRN*, localizado no braço curto do cromossomo 8, predispõe ao desenvolvimento de osteossarcoma em taxas mais baixas que a síndrome de Rothmund-Thompson (Goto et al., 1996).

Exatamente em quê a predisposição genética, bem como o que é esporádico, contribui para o desenvolvimento do osteossarcoma, permanece um mistério. O osteossarcoma não tem nenhuma translocação específica ou anormalidade molecular que possa servir como diagnóstico como ocorre com outros sarcomas, tais como o rabdomiossarcoma e o sarcoma de Ewing. A maioria os osteossarcomas tem anormalidades cromossômicas estruturais e numéricas complexas, com significantes variações e heterogeneidade ocorrendo no mesmo paciente. Tendem a ter mutações envolvendo inativação de genes supressores ou hiperativação de oncogenes (Boehm et al., 2000).

O número de estudos de anormalidades citogenéticas em osteossarcoma é maior que em outras patologias. Entre as anormalidades reportadas temos anormalidades numéricas, perdas completas ou parciais de regiões, rearranjos, ampliações de bandas cromossômicas, perdas ou ganhos recorrentes de cromossomos, bem como vários pontos de quebra e translocações recíprocas. Todas essas mutações levam a um genoma complexo e instável (Batanian et al., 2002).

O que está claro no osteossarcoma é que o número de proto-oncogenes está superexpresso, contudo não está claro como exatamente eles contribuem no desenvolvimento da doença. Dois oncogenes, *c-myc* e *c-fos* têm se mostrado superexpresso no osteossarcoma e parecem estar potencialmente envolvidos na sua formação. O *c-fos* está envolvido na diferenciação dos osteoclastos e na transformação dos osteoblastos. Outros genes têm sido implicados, contudo os dados são limitados e conflitantes (Wang et al., 2005).

Adequada manutenção de telômeros é essencial para a sobrevivência da maioria das células tumorais, que replicam muito rápido e descontroladamente. A maioria dos tumores emprega telomerase para manter os telômeros. Telomerase é

uma transcriptase reversa que adiciona repetidas unidades (telômeros) no final do DNA genômico. Osteossarcoma usa telomerase e mecanismo de recombinação (Sanders et al., 2004).

Anormalidades citogenéticas, mutações nas vias Rb e p53, presença de oncogenes e mecanismos de manutenção da telomerase contribuem para a patogênese do osteossarcoma. Contudo não é a presença de uma dessas anormalidades ou de diferentes expressões moleculares que levam a formação do tumor. É uma combinação de fatores que levam à doença.

3.1.3 Patologia

3.1.3.1 Histologia

O osteossarcoma é um tumor maligno bastante indiferenciado (alto grau histológico), resultante da proliferação de células alongadas, fusiformes no interior de um osso. Não é uma doença única, mas uma família de neoplasias que dividem o achado histológico de produção de matriz osteóide. É caracterizado pela presença de células malignas mesenquimais que produzem essa matriz osteóide ou osso imaturo (Rosemberg, 2005).

O osteossarcoma é um tumor de células progenitoras, que são multipotenciais, com células do periósteo e da medula com estroma hormônio-responsivo, que se diferem em várias linhagens, dependendo dos sinais do ambiente (Bianco et al., 2001).

Macroscopicamente são tumores grandes localizados na metáfise, com consistência mole ou endurecida; tendem a invadir o córtex, associados a componente de partes moles. Podem ter aspecto acinzentado e granular, enquanto outros tornam-se densos, escleróticos e de cor amarela-esbranquiçada.

O diagnóstico é baseado em critérios histopatológicos e correlação com achado radiológico. Na citologia tendem a ser anaplásicos, pleomórficos nas quais as células tumorais podem ter padrão: epitelióide, plasmocitóide, fusiforme, ovóide, pequenas células redondas, células claras, células mono ou multinucleadas. O diagnóstico histológico depende da presença de estroma sarcomatoso maligno associado com a produção de osteóide e osso. Grande variabilidade existe no padrão histológico e no grau de produção de osteóide. Podem ser divididos em variantes de alto e baixo grau, dependendo da celularidade, pleomorfismo, anaplasia e número de mitoses (Bramwell, 2000).

A imunoistoquímica e microscopia eletrônica são pouco utilizadas, mas podem ajudar para exclusão de outros diagnósticos. Pode apresentar imunorreatividade para citoceratina e actina de músculo liso e positividade de moderada a forte para CD99. Osteocalcina e osteonectina algumas vezes também são utilizadas para realçar o osteóide.

A

B

Figura 2 (A e B) - Fotomicrografias de lâmina de osteossarcoma convencional - HE 400x. (coloração Hematoxilina Eosina, aumento de 400 vezes).

O diagnóstico diferencial é extremamente amplo, porque há outros sarcomas que produzem matriz osteóide. As principais lesões que mimetizam são: sarcoma sinovial, condrossarcoma diferenciado, condrossarcoma de células claras e condrossarcoma mesenquimal, ou ainda miosite ossificante, osteocondromatose parosteal, ossificação heterotópica, calcinose tumoral.

3.1.3.2 Classificação

Classificamos radiologicamente em osteossarcoma clássico, de superfície (Periosteal e parosteal) e poliestótico.

São classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) conforme tipo celular predominante e produtos de proliferação celular em (Raymond et al. 2002):

1. Osteossarcoma convencional: clássico ou central é caracterizado por tumores grandes, metafisários, que tendem a invadir a córtex associado a partes moles. Histologicamente apresentam-se como tumores de células fusiformes. Podem produzir uma quantidade variada de cartilagem e tecido fibroso e são divididos conforme a matriz predominante em osteoblástico (50%), fibroblástico (25%) e condroblástico (25%). O valor desta subclassificação não está bem estabelecido porque ela é arbitrária e sujeita a erros de amostra (Dahlin e Unni, 1977).

2. Osteossarcoma teleangiectásico: hemorrágico ou aneurisma ósseo maligno ocupa grandes espaços com sangue com ou sem septos. Caracteriza-se por lesão lítica, destrutiva, com pouca ou nenhuma esclerose óssea e enorme área cística, necrótica ou hemorrágica, delimitadas por blocos de células anaplásicas com escassa produção de osteóide. Corresponde a aproximadamente 3% de todos os osteossarcomas (Dahlin

e Unni, 1977). Embora reportado às vezes com prognóstico desfavorável, estudos recentes não demonstram diferenças de prognóstico para esses pacientes (Bacci et al., 1989).

3. Osteossarcoma de pequenas células: é composto de pequenas células com graus variados de matriz osteóide. É uma variedade agressiva do osteossarcoma central, cujos aspectos mesclam os do osteossarcoma e do sarcoma de Ewing (Martin et al., 1982). O estudo imunoistoquímico tem papel fundamental no diagnóstico diferencial das neoplasias ósseas de pequenas células, separando entidades como linfoma, Tumor neuroectodérmico primitivo (PNET) e condrossarcomas mesenquimais de osteossarcomas de pequenas células (Devaney et al., 1993). Anticorpos como MIC2 são expressos nas células do sarcoma de Ewing e devem ser usados para esse propósito (Perlman et al., 1994).

4. Osteossarcoma central de baixo grau: intramedular bem diferenciado ou intraósseo de baixo grau se inicia na medular do osso (Choong et al., 1996).

5. Osteossarcoma parosteal: ou justacortical é um tumor de baixo grau que se inicia na superfície do osso. Acomete principalmente o sexo feminino, 81% acima dos 20 anos. Sua incidência varia de 1 a 10% dos osteossarcomas diagnosticados. É um tumor originário na superfície óssea, histologicamente bem diferenciado, que se caracteriza pela presença de osteóide bem individualizado e estroma fusiforme, com envolvimento não ultrapassando 25% da superfície (Okada et al., 1994).

6. Osteossarcoma periosteal ou condroblástico justacortical de grau intermediário: inicia-se na superfície do osso. Acomete preferencialmente região diafisária de ossos longos de indivíduos adolescentes. Tem incidência baixa, predominantemente condroblástico com áreas sarcomatosas ao lado de áreas onde observamos a produção osteóide (Ritts et al., 1987).

7. Osteossarcoma de alto grau de superfície ou justacortical de superfície formador de osso de alto grau: inicia-se na superfície do osso (Raymond et al., 2002).

8. Osteossarcoma secundário: ocorre em ossos previamente afetados por anormalidades como doença de Paget e radioterapia.

9. O osteossarcoma extra-ósseo: é um tipo de sarcoma não rabdômio incomum, que cresce fora dos ossos e que ocorre mais frequentemente em tecidos de partes moles da extremidade inferior em adultos de meia idade. Tem sido relatado como complicação de radioterapia. Ocorrem recorrência local e metástases à distância. Deve ser tratado como osteossarcoma (Dahlin e Unni, 1977; Bane et al., 1990).

10. Osteossarcoma multicêntrico ou multifocal: é uma entidade rara nas quais múltiplos tumores ósseos estão presentes ao diagnóstico e cada lesão lembra um tumor primário. Não está claro se tais sarcomas crescem de múltiplos locais ou se uma das lesões é o verdadeiro primário e ocorreu uma disseminação rápida para outros locais sem haver metástases pulmonares (Dahlin e Unni, 1977; Hopper et al., 1990). O osteossarcoma multifocal pode ser:

- sincrônico, que é de alto grau, esclerosante, intramedular e letal em 6 meses
- metacrônico, que é menos agressivo.

É difícil excluir o desenvolvimento de lesões sequenciais com metástases ósseas (Czerniak, 1998).

11. Fibrohistiocitoma maligno (FHM): é um subtipo de osteossarcoma que distingue do fibrohistiocitoma maligno do osso pelo encontro de tumor osteóide no componente ósseo do tumor. Embora rara, essa variante acomete um terço dos pacientes com mais de 60 anos. Ambos têm comportamento de sarcoma de alto grau e a distinção é apenas acadêmica (Ballance et al., 1988).

12. Osteossarcoma primário de mandíbula: ocorre frequentemente em pacientes idosos, com tendência à diferenciação condróide e é associado a curso indolente, tendo propensão mais a recorrência local do que metástases à distância, principalmente se o tumor for de baixo grau (Bertoni et al., 1991).

3.1.4 Apresentação Clínica e Padrões de Disseminação

3.1.4.1 Quadro clínico

A maioria dos pacientes com osteossarcoma apresenta dor persistente e severa na área envolvida, tendo ou não comprometimento de partes moles. O exame locorregional revela limitação funcional da articulação adjacente, associado à tumoração e edema.

A média de duração dos sintomas é de três meses, embora história de seis meses ou mais não seja incomum. Perda ponderal é associada à doença disseminada.

Sintomas sistêmicos como febre e emagrecimento ocorrem raramente, a não ser em doença avançada (Czerniak, 1998).

Caracteristicamente envolve ossos longos, invariavelmente a metáfise, especialmente próxima ao joelho. Envolvimento de ossos chatos do esqueleto axial ocorre entre 10 a 20 %.

3.1.4.2 Disseminação

Os mecanismos de desenvolvimento do osteossarcoma são mais complicados que os mecanismos de metastatização, contudo, a identificação de genes que são cruciais para a disseminação também são de grande interesse porque serão capazes de explicar melhor processos celulares e moleculares envolvidos e com isso encontrar alvos terapêuticos específicos. Um número potencial de vias e genes tem sido estudados para melhor entendimento das metástases e sua relação com a patogênese do osteossarcoma (Melo et al., 2003).

O processo como o câncer primário metastatiza é extremamente complexo e parece que cada tipo tem um modo de metastatização. Ele geralmente ocorre através de vários passos que incluem a invasão de tecidos adjacentes, intravasão, transporte através da circulação, parada em sítio secundário, extravasão e crescimento no órgão secundário. O número de barreiras existentes para a célula que vai metastatizar e evitar a morte celular (apoptose) é crucial no desenvolvimento das metástases (Meyer e Hart, 1998).

Para metastatizar as células fazem interação célula-célula. Depois migram para a matriz extracelular. Após, degradam essa matriz extra-celular. Esse processo geralmente rearranja o citoesqueleto de actina. Quando as células fazem isto, a apoptose geralmente é sinalizada e iniciada, devido à perda da interação célula-

célula. Este tipo de apoptose é referido como anoikis. A próxima barreira envolve intravasão, ou seja a passagem de células metastáticas pela corrente sanguínea. Mecanismos de estresse interagem com vasos sanguíneos e células imunes como as células NK, começam a circular. Células metastáticas devem ser capazes de sair do sistema circulatório e invadir sítios secundários.

Resistentes a mecanismos de estresse completam o processo de extravasamento, deixando a circulação sanguínea e indo direto para sítios secundários (organotropismo). Esses sítios que geralmente são os alvos das células metastáticas, são órgãos com extensa rede de capilares. O desenvolvimento de micro-metástases em sítios secundários é o passo mais crucial e onde as células são mais susceptíveis a apoptose. A razão para isso é que as células metastáticas devem ser capazes de interagir célula-célula e devem ser capazes de obter fontes de sangue e nutrientes através de angiogênese. Se esse processo não ocorrer satisfatoriamente, as células irão induzir apoptose e morrer (Mehlen e Puisieux, 2006).

À semelhança de outros tumores, o osteossarcoma pode se propagar para além do osso para tecidos próximos como músculos, tendões e gordura. Células cancerosas de osteossarcoma podem se disseminar através do sangue (via hematogênica) para outros ossos, pulmões ou órgãos internos. Metástases sincrônicas ou metacrônicas usualmente envolvem os pulmões.

Osteossarcoma metastático tem grande importância clínica e ainda permanece um enigma. Diversos grupos de pesquisa têm tentado identificar genes e proteínas que são importantes para o processo de metástases.

3.1.5 Avaliação Clínica e Diagnóstica

A avaliação de um paciente portador de tumor ósseo se faz com história clínica, exame físico e estudo radiológico.

3.1.5.1 Avaliação radiológica do tumor primário

1. Radiografia simples

A radiografia simples é o principal exame na avaliação do tumor ósseo, justificando a biópsia. A localização metafisária é o local mais comum de envolvimento no osteossarcoma convencional, seguido pela localização diafisária.

Usualmente revela destruição permeativa de padrão trabecular e intensiva reação periosteal descrita como “raios de sol” e triângulo de Codman, que revela comportamento agressivo, mas não necessariamente maligno (Kesselring e Penn, 1982).

Nenhuma imagem radiológica é patognomônica de osteossarcoma, sendo que 45% deles apresentam-se com padrão esclerótico, 30% lítico e 25% misto. Fratura patológica é vista em 15-20% dos casos, tanto ao diagnóstico quanto durante a terapia e tem pequeno impacto no prognóstico (Czerniak, 1998).

2. Tomografia computadorizada

A Tomografia computadorizada é um exame adjunto à radiografia convencional usada para detectar lesões em ossos, pequenas lesões adjuvantes ao endóstio e extensão tumoral para partes moles e estruturas vasculares.

3. Cintilografia óssea

A cintilografia óssea utiliza o radionucleotídeo ^{99m}Tc , que pode ser marcado com MDP, e é útil na determinação da extensão intraóssea. Pode ser marcado também com MIBI, que é usado para avaliação de resposta e detecção de recorrência. É um exame muito sensível e pouco específico (Nadel e Stilwell, 2001). Já Gorlick et al. (2001) publicaram que não há correlação entre cintilografia com $\text{Tc}^{99}\text{-MIBI}$ e P-glicoproteína e que esse resultado indica que imagens com MIBI não são preditores de resposta histológica.

FDG-PET (Fluorodeoxyglucose positron emission tomography scan) pode guiar a biópsia para a área biologicamente mais ativa nos tumores heterogêneos, pode diferenciar edemas e lesões pós-operatórias de tumor residual viável e monitorizar resposta à terapia.

FLT – 18F (Fluortimidina) avalia a proliferação celular, mas não se encontra disponível no Brasil.

4. Ressonância nuclear magnética

A Ressonância magnética é útil para determinar a extensão do tumor para partes moles, para articulação adjacente, presença de “*skip metastasis*”, além de sua relação com estruturas circunjacentes (Hoffer et al., 2000). Holscher et al. (1995) concluíram que o aumento do volume do tumor e o aumento de intensidade de T2 do tumor extra-ósseo podem ser preditivos de maus respondedores.

Ressonância Nuclear Magnética com Aumento do Contraste Dinâmico difere o tumor viável do não viável ou inflamação e também quantifica necrose. É igual ou superior ao PET-CT.

3.1.5.2 Avaliação radiológica das metástases

1. Tomografia computadorizada

É o método mais sensível na detecção de metástases pulmonares (nódulos pulmonares associados à calcificação e pneumotórax). Picci et al. (2001) concluíram que o valor preditivo da tomografia computadorizada é limitado, mas ainda é a técnica usada como referência.

Kayton et al. (2006) relatam que a correlação entre o número de lesões identificadas pela tomografia e o número de metástases ressecadas pela cirurgia é pobre. Numa série de 54 toracotomias a tomografia subestimou o número de lesões patológicas em mais de um terço dos casos (35%).

2. Cintilografia óssea

A cintilografia óssea com radionucleotídeo ^{99m}Tc marcado com MDP é útil na determinação de metástases, doença polioestótica, lesões sincrônicas, “*skip metastasis*” (lesões saltitantes).

3.1.5.3 Estudos de Acompanhamento

Avaliação radiográfica é um componente crítico no acompanhamento dos pacientes tratados com cirurgia e quimioterapia, bem como vigilância para doença metastática e recorrência local. Pacientes com osteossarcoma devem ser vigiados por cinco anos, devido o risco de recorrência pulmonar assintomática. Radiografia simples deve ser realizada periodicamente e, frente a qualquer anormalidade, realizar tomografia computadorizada (Wittig et al., 2002). A detecção precoce das metástases é muito importante (Link e Eilberg, 2002).

Embora metástases ósseas produzam sintomas, ocasionalmente metástases assintomáticas são detectadas na cintilografia óssea e devem ser confirmadas por radiografias. A avaliação do sítio primário também não deve ser negligenciada, devido possibilidade de recorrência local (Brennan et al., 2001).

3.1.5.4 Biópsia

A biópsia é sempre requerida para confirmar o diagnóstico. Deve ser feita por ortopedista experiente, fornecendo quantidade de material adequado, preferencialmente pelo mesmo profissional que vai realizar o procedimento definitivo. Pode ser incisional ou percutânea com trefina. Deve ser bem planejada para não interferir no tratamento subsequente. É essencial que a região de cicatriz seja ressecada em bloco com o tumor durante o procedimento cirúrgico definitivo (Enneking e Springfield, 1977).

3.1.5.5 Estadiamento

O estadiamento é multifacetado. O sistema de estadiamento pré-cirúrgico é avaliado pelo *Musculoskeletal Tumor Society* (MSTS), *American joint Commitee on Cancer* (AJCC) e *International Union Against Cancer* (UICC) (Wolf e Enneking, 1996).

O estadiamento MSTS é baseado na classificação do grau, localização e linfonodo envolvido/metástase. Grau é categorizado em alto e baixo. Localização é categorizada em intra ou extracompartimental. Como o envolvimento linfonodal é raro é definido como presença ou ausência de metástases (Malawer et al., 2005).

Estadiamento cirúrgico MSTS

Estádio	Grau
IA, IB	baixo grau, sem metástases.
IIA, IIB	alto grau, sem metástases.
IIIA, IIIB	alto ou baixo grau, com presença de metástases.

Os sistemas de estadiamento AJCC e UICC são idênticos. Utilizam as mesmas três categorias citadas acima e incluem uma quarta: envolvimento de linfonodo ou estado nodal (N). O sistema AJCC considera tamanho da lesão, presença de “skip metastasis” e tipo de metástase. (Malawer et al., 2005).

Estadiamento AJCC

Estádio	tamanho do tumor	envolvimento de linfonodo	grau
IA	≤ 8cm	sem LN ou M	baixo grau
II	≥ 8cm	sem LN ou M	baixo grau
IIA	≤ 8cm	sem LN ou M	alto grau
IIB	≥ 8cm	sem LN ou M	alto grau
III	skip metastasis	sem LN ou M	qualquer grau
IVA	qualquer	sem LN ou M	qualquer grau
IVB	qualquer	com LN ou M	qualquer grau

É comum o registro de câncer usar a classificação AJCC/UICC enquanto a maioria dos ortopedistas oncológicos usa o MSTS (Malawer et al., 2005).

Estadiamento TNM 2002

T (tumor primário)

Tx - tumor primário não pode ser medido

T0 - sem evidência de tumor primário

T1 - tumor com 8 cm ou menos no maior diâmetro

T2 - tumor com mais de 8 cm no maior diâmetro

T3 - descontinuação do tumor ósseo primário

N (linfonodos regionais)

Nx - linfonodos regionais não podem ser medidos

N0 - sem metástases linfonodais

N1 - metástase linfonodal regional

M (metástase à distância)

Mx - metástase à distância não pode ser avaliada

M0 - sem metástase à distância

M1 - metástase à distância

M1a - pulmão

M1b - outros órgãos à distância

Devido à inadequabilidade de padrões de estadiamento, estabeleceu-se o sistema Enneking, que é amplamente aceito para tumores esqueléticos e facilita a comparação de resultados de diferentes regimes terapêuticos (Enneking et al., 1980):

Sistema de ENNEKING

Estádio	grau e extensão anatômica
I	tumor de baixo grau
IA	intracompartimental
IB	extracompartimental
II	tumor de alto grau
IIA	intracompartimental
IIB	extracompartimental
III	qualquer grau com metástases

3.1.6 Fatores Prognósticos

Muitas variáveis são estudadas na tentativa de reconhecer pacientes de risco com osteossarcoma e tentar desenvolver terapias individualizadas. Essas variáveis incluem parâmetros clínicos e histológicos. Muitas são estatisticamente significativas como fatores preditivos de sobrevida.

Fatores como idade, sexo, localização anatômica do tumor, tamanho e necrose tumoral são as mais relacionadas à sobrevida, bem como estágio clínico (presença de metástases ao diagnóstico).

3.1.6.1 Idade

A maioria dos estudos é desenvolvida na faixa de adolescentes, sendo as demais faixas etárias raramente mencionadas. Existem trabalhos que mostram evolução desfavorável em menores de 10 anos (Mckenna et al., 1965) e em idosos (Delepine et al., 1988), porém não leva em conta presença de metástases, localização axial do tumor, tamanho do tumor, fratura patológica, margens cirúrgicas adequadas.

Winkler et al. (1984) mostraram que o prognóstico em menores de 12 anos é pior, porém Lee et al. (2007) não encontraram diferença estatística na sobrevida de pré-adolescentes e adolescentes. A maior série (1.136 pacientes) comparando pré-adolescentes e pacientes mais velhos também não mostrou diferença na sobrevida, concluindo que estes não precisam de tratamento diferenciado (Bacci et al., 2005). Existem grupos que defendem a similaridade de resposta entre os grupos etários, desde que sejam tratados com os mesmos princípios (Bacci et al., 1998; Fuchs et al., 1998).

Apesar da taxa de resposta ser menor, a qualidade da sobrevida é melhor nos pacientes entre 40 e 60 anos (Okada et al., 2004).

3.1.6.2 Sexo

Alguns relatos têm implicado o sexo como fator prognóstico isolado. Pacientes do sexo feminino geralmente tem sintomas mais prolongados e doença de baixo grau (Broström, 1980).

3.1.6.3 Localização anatômica do tumor

É uma variável importante. Revisões sugerem que tumores primários do esqueleto axial têm pior prognóstico porque não é possível a completa excisão cirúrgica com margens livres (Simon, 1978).

3.1.6.4 Tamanho do tumor

Uma das melhores formas de mensuração tumoral é através da medida absoluta das três dimensões. A *German Society for Pediatric Oncology* (GPO) considera pequenos aqueles tumores que medem um terço da extensão do osso e grandes quando medem mais que um terço.

A incidência de metástases está relacionada a tumores com volume tumoral absoluto maior que 150 cm³. Tumores volumosos e com pobre resposta à quimioterapia têm sobrevida inferior a 25% (Bieling et al., 1996; Matos et al., 2002; Kim et al., 2008).

O estadiamento TNM (Sobin e Wittekind, 2002) usa 8 cm como corte entre tumor T1 e T2.

Broström et al. (1982) mostraram em uma série de 57 pacientes que portadores de tumores menores que 10 cm têm melhor sobrevida (88% x 57%).

No estudo II do Grupo Brasileiro de Tratamento do Osteossarcoma (GBTO) foi possível fazer análise multivariada, notando-se que entre os fatores independentes

de risco mais importantes estavam o tamanho maior ou igual a 15 cm no maior eixo (Petrilli et al., 1991b).

O protocolo PINDA (Chile) considera tumores grandes aqueles maiores que 100 cm² e propõem tratamentos diferentes conforme o tamanho – 2 drogas para os pequenos (Cisplatina e Doxorrubicina) e 3 ou 4 drogas para os grandes (Cisplatina, Doxorrubicina, Metotrexate e Ifosfamida).

3.1.6.5 Resposta à quimioterapia pré-operatória (Grau de necrose tumoral)

Vários critérios de avaliação são usados para verificar o grau de necrose tumoral pós quimioterapia, como os criados por Ayala et al. (1984), Salzer-Kuntschik et al. (1983) e Huvos et al. (1977). A maioria define como boa resposta à quimioterapia pré-operatória, o encontro de menos que 10% de células tumorais viáveis residuais na peça cirúrgica.

Isto foi confirmado como fator prognóstico mais importante em meta-análise de estudos prospectivos (Davis et al., 1994).

A necrose tumoral está relacionada à doença, ao hospedeiro e ao tratamento. O critério de grau de necrose induzido pela quimioterapia mais utilizado é o classificado pela escala de Huvos Ayala:

Grau I – pobre resposta ou sem efeito da quimioterapia

Grau II – resposta moderada com áreas de tumor osteóide acelular, necrose, fibrose atribuídos à quimioterapia.

Grau III – predomínio das áreas com tumor osteóide acelular, necrose, fibrose com focos discretos de células tumorais viáveis.

Grau IV – ausência de células tumorais viáveis.

Raymond et al. (1987) agruparam em:

Grupo 1 – grau de necrose Huvos I e II considerados maus respondedores ao esquema quimioterápico.

Grupo 2 – grau de necrose Huvos III e IV considerados bons respondedores ao esquema quimioterápico.

Estudos mostram sobrevida livre de doença em 5 anos de 80% para Huvos IV (ausência de células viáveis), 61% para Huvos III (entre 90 e 99% de necrose) e 47% para os maus respondedores (Huvos I e II) (Raymond et al., 1987).

Apesar de usualmente caracterizarmos os pacientes como bons e maus respondedores ao esquema quimioterápico a resposta não deve ser interpretada como fenômeno de “tudo ou nada”, mas sim como um efeito gradual. Mesmo pacientes com mais de 50% de células viáveis remanescentes ainda tem melhor prognóstico do que os pacientes que não apresentaram resposta (Bielack et al., 2002) e melhor prognóstico que aqueles que não receberam quimioterapia (Link et al., 1986).

Davis et al. (1994) fez uma revisão crítica de 8 artigos publicados no período de 1973 a 1992 e encontrou o grau de necrose tumoral pós- quimioterapia como o fator prognóstico mais importante.

3.1.6.6 Metástase ao diagnóstico

Osteossarcoma assim como outros tumores ósseos disseminam principalmente por via hematogênica para pulmão com grande impacto no prognóstico do paciente (Rossi et al., 1995). É um dos piores fatores prognósticos, tanto em análises uni como multivariadas, sendo menor que 20% a sobrevida livre de doença em 5 anos (Brockstein, 2004).

1. Metástases Regionais

Tumores que crescem dentro do mesmo osso (metástases intraósseas) ou através da articulação vizinha (metástases trans-articular) são chamados de “*skip metástases*” (Bacci et al., 1992). A presença dessa metástase óssea sincrônica regional representa um papel importante na recidiva local (Simon, 1978). Esses pacientes apresentam prognóstico pior, equivalente aos com metástases à distância.

O COSS relata presença de 1,4% de “skip metástases” diagnosticada em uma série de 1.765 pacientes (Kager et al., 2006).

2. Metástases à distância

Sem tratamento adequado, a maioria dos pacientes com doença aparentemente localizada desenvolverá metástases secundárias dentro de um a dois anos. Esse fato coloca de forma implícita o conceito de que micrometástases estão presentes no momento do diagnóstico (Arndt e Crist, 1999).

Relata-se que ao diagnóstico 10-20% dos pacientes apresentam metástases à distância. Países em desenvolvimento parecem apresentar maior incidência de metástases ao diagnóstico, chegando a 20 - 35%, sendo a maioria em pulmões (70%), 18% combinada, raramente em ossos (10%) e mais raramente ainda em linfonodos, fígado, cérebro, pericárdio, rins e suprarrenal. Das metástases pulmonares 37% apresentam-se unilaterais e 48% bilaterais (Bielack et al., 2002).

3. Metástases pulmonares

O Pediatric Oncology Group (POG) usa como fator de risco a presença de 8 nódulos pulmonares ou mais (Harris et al., 1998). Já o Japanese Musculoskeletal Oncology Group usa a presença ou ausência de metástases ósseas, tipo de

envolvimento pulmonar (uni ou bilateral), número de nódulos menor ou igual a 3 (Tsuchiya et al., 2002). De modo geral, considera-se que quando apresentam em número menor que 5 e podem ser totalmente ressecados o prognóstico é melhor do que quando há dificuldade em se colocar o paciente em remissão através de ressecção cirúrgica.

4. Metástases ósseas

Pacientes metastáticos para pulmão tendem a ter melhor sobrevida que os metastáticos para ossos. Esses geralmente têm tumores grandes com intervalo de início dos sintomas até o diagnóstico curto, refletindo grande agressividade (Merimsky et al., 2004).

3.1.6.7 Marcadores bioquímicos

O nível sérico de desidrogenase láctica (DHL) está relacionado à extensão tumoral e é um fator prognóstico desfavorável segundo o COSS 80 e 86.

No *Multi Institutional Osteosarcoma Study* (MIOS) o nível elevado de DHL ao diagnóstico foi relacionado à maior falência terapêutica e fator prognóstico adverso para pacientes com osteossarcoma não metastático de extremidades tratado com quimioterapia adjuvante (Link et al., 1991).

Bacci et al. (2004) e Wu et al. (2009) concluem que níveis acima do normal de DHL estão relacionados com metástases pulmonares (p: 0,001), Castro et al. (2008) publica que níveis acima de 500 UI/l estão relacionados com pior sobrevida e Rech et al. (2004) mostra que nível sérico acima de 1.000 UI/l representa fator prognóstico desfavorável.

Os altos níveis de fosfatase alcalina (Falc) e grandes volumes tumorais também têm sido associados a pacientes com metástases. Elevações pós-operatórias sugerem doença persistente, metastática ou recorrente (Czerniak, 1998).

Broström et al. (1980) ainda refere o valor de hemossedimentação (VHS) como fator prognóstico adverso.

3.1.6.8 Tipo histológico

Osteossarcoma não é uma doença homogênea, e sim um grupo de doenças com potencial biológico diferente. Pode apresentar um tipo histológico predominante o que justifica uma classificação.

Osteossarcoma parosteal e o intraósseo bem diferenciado são associados com prognósticos favoráveis enquanto o osteossarcoma periosteal tem prognóstico intermediário. Entre as variantes do osteossarcoma convencional parece não haver relação entre o subtipo histológico e a sobrevida global (Uribe-Botero et al., 1977). Alguns relatos mostram que o subtipo condroblástico apresenta resposta pobre e os subtipos teleangiectásicos e fibroblásticos melhor resposta, enquanto o osteoblástico apresenta resposta intermediária (Bacci et al., 2001a).

3.1.6.9 Atraso diagnóstico

O senso comum sugere que se o tumor crescer por longo tempo é mais fácil espalhar. Contudo, evidências científicas mostram que isso pode não ser verdade e confirmam que o tempo dos sintomas ao diagnóstico não está necessariamente relacionado com a presença de metástases (Petrilli et al., 2006; Bacci et al., 2002c).

3.1.6.10 Fratura patológica

Pacientes com osteossarcoma que apresentam fratura patológica ao diagnóstico ou durante a quimioterapia pré-operatória tem um risco aumentado de recorrência local e taxa de sobrevida diminuída comparado com outros pacientes (Scully et al., 2002).

3.1.6.11 Vascularização tumoral

Kreuter et al. (2004) demonstraram significativa associação de densidade da microvasculatura (MVD) intratumoral com sobrevida em um grande grupo de pacientes com osteossarcoma e correlação com a resposta à quimioterapia.

3.1.6.12 Marcadores moleculares

Atualmente está se tentando achar marcadores moleculares que sejam fatores prognósticos, porém há uma variedade muito grande de alterações genéticas que resultam na inativação de genes supressores de tumor ou na super-expressão de oncogenes (Ragland et al., 2002; Leonard et al., 2003).

Alguns estudos têm sido realizados com resultados promissores (Ilic et al., 2004).

1. Expressão Her-2

O gene *c-erbB2* que se localiza no cromossomo 17q21 (Fukushige et al., 1986) codifica uma proteína transmembrana denominada HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor). Está presente em 40-45% dos casos de osteossarcoma e relacionado à pior sobrevida livre de eventos, menor necrose tumoral, maior potencial de metástases (Onda et al., 1996; Fuchs e Pritchard, 2002). Gorlick et al.

(1999) mostraram 42% de positividade no osteossarcoma, associado com presença de metástases e pobre resposta histológica à quimioterapia neoadjuvante. Pacientes com alta expressão de *c-erbB-2* tem taxa de sobrevida em 3 anos de 14% em contraste com pacientes que não expressam que a taxa foi de 84% (Ferrari et al., 2004).

2. Glicoproteína P

A pesquisa do glicoproteína P (*pgP*), quando positiva, tem evolução desfavorável, com aumento da incidência de recidiva (Serra et al., 1999). Baldini et al. (1995) publicam que níveis aumentados de P-glicoproteína estão associados com aumento significativo de eventos adversos e é independente da extensão da necrose.

3. Expressão de *RFC/MDR1*

Além desses, os mecanismos de resistência a drogas também têm sido bastante estudados. Genes como *RFC* (carregador de folato reduzido), envolvido no metabolismo do metotrexate e *MDR1* (resistência a múltiplas drogas) são associados à quimio-resistência (Baldini et al., 1995).

4. Perda da heterozigosidade (LOH) do gene *Rb*

Uma das alterações genéticas melhor caracterizadas é a perda da heterozigosidade do gene do retinoblastoma (*RB*) (Berman et al., 2008). O produto desse gene é uma proteína que atua como supressora do crescimento das células com DNA danificado. A perda da função desse gene permite que as células cresçam levando à formação de certos tumores, incluindo o osteossarcoma. A perda da heterozigosidade (LOH) do locus no cromossomo 13 foi demonstrada em 60-70%

dos tumores. A presença dessa mutação tem sido associada com a diminuição da sobrevida (Feugeas et al., 1996).

5. Amplificação do *p53*

A amplificação do gene *p53* tem papel importante na biologia deste tumor. O gene supressor de tumor localizado no cromossomo 17 está alterado em mais de 50% dos casos, mas não associado a prognóstico pobre em osteossarcoma (Gorlick e Anderson, 2003).

Chen et al. (2007) relatam um estudo de análise imunoistoquímica de 35 pacientes onde a expressão de *p53*, *p16*, *PTEN*, *eZRIN*, *BETA* catenina, *VEGF* e *PIGF* não se mostrou preditora da evolução clínica de pacientes portadores de osteossarcoma.

6. Disfunção de telômeros

Uma das explicações para cariótipos complexos seria a disfunção dos telômeros. Uma das funções dos telômeros é regular como as células podem se dividir. Mais de 50% dos osteossarcomas usa a via dos telômeros como alternativa. Expressão de telomerase é associada com diminuição da sobrevida livre de progressão e global (Sanders et al., 2004).

7. Metaloproteinase 9

MMP-9 (matriz metaloproteinase), que é uma enzima que envolve a quebra de componentes entre as células, está associada com o risco aumentado de formação de metástases (Chang et al., 2001; Foukas et al., 2002).

8. Polimorfismo

Polimorfismo é a variação que ocorre naturalmente na sequência do DNA e difere das mutações gênicas por ocorrer em uma frequência de pelo menos 1% na população geral. Embora a grande maioria dos polimorfismos seja funcionalmente neutra, eles podem ter efeitos na regulação da expressão gênica ou na função da proteína codificada. Genes *GST* (glutathione S transferase) são altamente polimórficos na população e tem sido associado a níveis de atividade de enzimas, tornando-os candidatos na investigação de mecanismos de toxicidade (Wang et al., 2002).

9. TGF- β

TGF- β é um fator de crescimento encontrado em nível mais alto em osteossarcoma de alto grau do que de baixo grau (Franchi et al., 1999) e é um conhecido inibidor do produto do gene *RB*, contribuindo para comportamento agressivo.

10. Ki-67

O índice de proliferação celular Ki-67 é pouco estudado neste tipo de sarcoma. Marinho et al. (2005) mostraram correlação entre os pacientes não metastáticos do tempo de sobrevida livre e Ki-67, porém não mostrou entre os pacientes metastáticos.

11. Caderinas

As caderinas são moléculas de adesão célula-célula presentes em tecidos cuja ação é dependente do cálcio. Na ausência de cálcio sofrem alterações conformacionais e são rapidamente degradadas por enzimas proteolíticas (Alberts et

al., 1997). São as principais moléculas de adesão dos epitélios. Também exercem influência na manutenção da forma e polaridade das células em um tecido. O gene que condiciona a expressão da E-caderina encontra-se no cromossomo 16q (Umbas et al., 1992). Existem vários trabalhos que correlacionam a perda ou a diminuição da expressão da E-caderina com maior risco de invasão e metástases em diversos tipos de tumores. Alteração na expressão das caderinas pode estar relacionada a metástases e morfologia do osteossarcoma (Monaghan et al., 2001; Kashima et al., 2003).

12. Gene *p16*

O gene *p16* é encontrado em 10-15% dos casos de osteossarcoma e já foi demonstrado estar relacionado a pior sobrevida (Maitra et al., 2001).

13. Gene *MET*, *FOS* e *MYC*

A super-expressão dos genes *MET* e *FOS* tem sido relatada em mais de 50% dos casos, enquanto o *MYC* está relatado em 15%, sendo mais frequente em tumores metastáticos ou recidivados (Raymond et al., 2002). Essas alterações em conjunto com a inativação do gene *Rb* são uma constante na patogênese do osteossarcoma.

14. VEGF

VEGF, um fator de crescimento responsável pela angiogênese do tumor, mostrou-se como preditivo de metástases pulmonares e pior prognóstico (Kaya et al., 2000).

15. Genes *THB-SE*, *SPARC*, *SPPI*

Dalla-Torres et al. (2006) identificaram três genes diferencialmente expressos em osteossarcoma. O *THB-SE* foi altamente expresso em biópsias de tumores de pacientes com doença metastática, sugerindo ser um marcador de agressividade. A expressão elevada de *SPARC* foi encontrada em 96,3% das biópsias e correlacionou-se com pior SLE. Expressão elevada de *SPPI* mostrou correlacionar-se com melhor sobrevida, sugerindo ser um bom marcador.

16. *CYP*

O citocromo p450 (*CYP*) facilita a invasão tumoral e a produção de metástases por gerarem espécies reativas de oxigênio e pela ativação de proteínas cinase. Estão envolvidos na ativação específica e na detoxificação de um grande número de agentes anti-câncer como ifosfamida, doxorubicina e etoposide. Dhaini et al. (2003) concluíram que a expressão do citocromo p450 CYP3A4/5 prediz a presença de metástases e pior prognóstico em osteossarcoma, podendo ser usado como marcador biológico.

17. Antígenos *MAGE*, *BAGE*, *GAGE/PAGE* e *LAGE/NY-ESO-1*

A última década tem sido caracterizada pelo isolamento de genes que codificam antígenos tumor-específico, incluindo famílias como *MAGE*, *BAGE*, *GAGE/PAGE* e *LAGE/NY-ESO-1*. Esses antígenos são expressos em vários tipos de tumor (Kirkin et al., 2004).

18. XIAP, c-Kit e CD117

Estudos recentes ainda relatam como promissores marcadores prognósticos a XIAP, proteína inibidora de apoptose ligada ao X (Yang et al., 2008), Runx2 (Won et al., 2009) e discutíveis como c-Kit ou CD117, que em alguns trabalhos mostram-se como marcadores prognósticos (Wei et al., 2008) e outros não (Sulzbacher et al., 2007).

19. Gene *anxA2*

Um gene encontrado foi a annexin 2 (*anxA2*). Super-expresso em osteoblastos leva a diferenciação. Acredita-se que células tumorais poderiam mais facilmente metastatizar se não fossem induzidas à diferenciação; logo, a perda de annexin 2 poderia ser favorável (Gillette et al., 2004).

20. Sinalização do Fas

A via de sinalização Fas também tem sido implicada na formação de metástases do osteossarcoma. Essa via trabalha na indução do sinal de apoptose quando o Fas da membrana da célula interage com o receptor Fas ligand (FasL) de outra célula. Resistência à sinalização de Fas poderia ser importante, porque permite à célula tumoral evadir-se do sinal de apoptose (Worth et al., 2002), assim como aumento da expressão de Fas tem mostrado aumento na sensibilidade de morte celular Fas induzida no osteossarcoma (Lafleur et al., 2004).

Muitas variáveis citogenéticas existem no osteossarcoma e a presença de padrões preditivos ainda permanece ausente.

3.1.6.13 Tratamento

Um fator prognóstico importante é o tipo de tratamento utilizado e a equipe que administra esse tratamento, sabendo-se que centros de referência para este tipo de tumor com equipe multidisciplinar treinada e coesa, que tratam muitos casos por ano têm melhores condições de alcançar sucesso no tratamento (Cassone et al., 1998).

3.1.6.14 Outros

Outros fatores como raça, número de mitoses por campo de grande aumento, invasão vascular, invasão linfática e de partes moles são relatadas, porém não há consenso sobre quais variáveis podem ser usadas para estratificar o risco (Bastos et al., 1999).

3.1.7 Tratamento

O objetivo do tratamento é curar preservando o máximo de função possível. As armas terapêuticas usadas no tratamento são:

3.1.7.1 Quimioterapia

A utilização de esquemas quimioterápicos é um marco importante na história do Osteossarcoma. Antes dos anos 1970, os pacientes eram submetidos somente ao tratamento cirúrgico com amputação e 80% deles morriam, a maioria de metástases pulmonares (Link et al., 1986).

No início da década de 70, agentes quimioterápicos como Adriamicina e altas doses de Metotrexate mostraram-se ativos contra o osteossarcoma, com taxas de cura de 40-65%. Esse aumento na sobrevida atribuído à quimioterapia foi desafiado pela

Mayo Clinic que não aceitava o controle histórico de sobrevida de 20% para cirurgia apenas e realizou um estudo de modo randomizado com cirurgia e altas doses de Metotrexate, demonstrando sobrevida semelhante em ambos, em torno de 40% (Taylor et al., 1978).

No período entre 1982 e 1984, Link (1993) randomizou pacientes com osteossarcoma de extremidade não metastáticos para amputação isolada ou para amputação seguida de quimioterapia e foi observado que o grupo de quimioterapia adjuvante apresentou maior sobrevida livre de doença (61% x 11% $p=0,005$). Mais tarde estudos adicionais foram feitos em diversas instituições norte-americanas (M.D. Anderson Cancer Center, Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC), St Jude Children's Research Hospital) num estudo multi-institucional denominado MIOS liderado por Link (1993) e validaram o controle histórico e a eficácia do Metotrexate altas doses, mostrando superioridade da quimioterapia adjuvante sobre observação.

O Intitute Rizzoli na Itália também reproduziu tal estudo. Posteriormente nenhuma outra discussão a respeito da necessidade ou eficácia da quimioterapia ocorreu (Bacci, 1990).

1. Fármacos

A lista de fármacos empregados contra o osteossarcoma é muito restrita. Atualmente, methotrexate em altas doses, doxorubicina, cisplatina e ifosfamida são consideradas as drogas mais ativas. Agentes derivados como a epirrubicina e a carboplatina têm sido avaliados (Wang et al., 1971; Jaffe, 1972; Ochs et al., 1978; Gasparini, 1986). Essas drogas têm diferentes mecanismos de ação, contudo o alvo é sempre o ácido nucleico.

2. Carboplatina x cisplatina

Estudos sugerem que cisplatina é mais efetiva que carboplatina, embora a cisplatina seja associada a mais toxicidade (Daw et al., 2006). A amifostina, droga citoprotetora foi utilizada para evitar efeitos neurotóxicos e ototóxicos da cisplatina (Petrilli et al., 2002). Bacci et al. (2000) mostraram que pacientes que receberam cisplatina em infusão prolongada (5h x 1h) obtiveram maior taxa de bons respondedores (68% x 47% p=0,04).

3. Antraciclinas

As antraciclinas são as drogas com maior atividade no osteossarcoma. A cardiotoxicidade, porém é um fator limitante e preocupante. Alguns fatores podem aumentar o risco desta complicação, como a faixa etária pediátrica e o acúmulo de dose desses quimioterápicos (Lipshultz et al., 1995). A liberação de radicais livres é um dos principais mecanismos envolvidos na miocardiopatia induzida pelo doxorrubicina. Substâncias que evitam a liberação desses radicais como o dexrazoxane têm se demonstrado útil na redução do surgimento deste efeito tóxico (Lipshultz, 1996).

4. Ifosfamida

Adição de ifosfamida não melhorou as taxas de sobrevida. No entanto, quando associado ao imunoestimulador Muramyl Tripeptide liposomal (MTP) tem melhor resultado que o tratamento padrão (Meyers et al., 2008).

O guia prático do National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomenda como esquema terapêutico quimioterápico regimes que incluem doxorrubicina, cisplatina, ifosfamida e altas doses de methotrexate.

Uma revisão do tratamento do osteossarcoma feita por Ferguson e Goorin (2001) conclui que o “esquema de terapia ótima ainda esta sendo investigado, bem como a intensificação da dose”.

5. Quimioterapia neoadjuvante (pré-operatória)

No início dos anos 70, as cirurgias conservadoras estavam começando a substituir a amputação. Nesta época as próteses eram feitas antecipadamente para as medidas necessárias e levavam semanas para serem construídas. Diferente dos dias atuais, onde é possível usar próteses modulares que são montadas no ato cirúrgico. Desta forma a cirurgia tinha que ser retardada consideravelmente. Na tentativa de cobrir este período, foi introduzida a quimioterapia pré-operatória.

O início imediato da quimioterapia pode levar a resultados superiores comparado com o atraso causado pela cirurgia e período de cicatrização. Por outro lado, há discussões sobre a possibilidade de progressão local e disseminação de novas metástases durante o período em que o tumor não foi ressecado, principalmente em tumores quimiorresistentes.

A finalidade da quimioterapia pré-operatória é facilitar a cirurgia com margens adequadas, aumentar as taxas de preservação de membros, proporcionar amputações mais econômicas com menor risco de recidivas locais e desta forma oferecer melhores próteses, melhor qualidade funcional, tratar precocemente as micro-metástases e diminuir as metástases sistêmicas enquanto aguarda o momento da cirurgia (Picci et al., 1990). É também uma oportunidade única de avaliar a eficácia da combinação de drogas contra a neoplasia, estudando o espécime cirúrgico e a necrose do tumor, identificando os grupos de risco. Porém o maior risco da quimioterapia neoadjuvante é atrasar o procedimento cirúrgico naqueles tumores não

respondedores o que aumenta a possibilidade da disseminação sistêmica de células tumorais resistentes a drogas (Wittig et al., 2002).

Diferente de outros tumores o osteossarcoma não diminui mesmo se a quimioterapia for efetiva. Isso é devido a matriz osteóide que se mantém intacta, mesmo após as células tumorais terem sido destruídas. A maioria das vezes há melhora da dor, dos movimentos e desaparecimento do edema e calor local, mas nem sempre diminuição do perímetro tumoral.

Diversos investigadores mantêm a recomendação da quimioterapia neoadjuvante pela informação prognóstica obtida através do espécime cirúrgico, identificando os grupos de risco e por acreditar no aumento do número de candidatos a cirurgia conservadora, mesmo sem aumentar a sobrevida global ou livre de eventos (Winkler et al., 1984; Weiner et al., 1986; Meyers et al., 1992; Bacci et al., 2003).

Bacci et al. (2002a) reportaram que a intensificação do tratamento pré-operatório não aumenta a taxa de bons respondedores para o tumor primário e nem o prognóstico final.

Implícito nesta estratégia que a resposta do tumor primário reflete o efeito da eficácia da quimioterapia nas micrometástases Nachman et al. (1987) testaram a resposta histológica simultaneamente no tumor primário e na metástase e encontraram discordância, que deve ser explicada pela heterogeneidade das células tumorais (Sprengli e Dexter, 1983).

Meyer e Hart (1998) reportaram 58% de bons respondedores no protocolo T7 que recebeu mais ciclos de quimioterapia pré-operatória versus 34% no protocolo T10, chamando a atenção a respeito da proporção entre grau de necrose e número de ciclos de quimioterapia neoadjuvante. Em estudo subsequente, o T12, na tentativa de demonstrar que intensificando a quimioterapia o grau de necrose seria maior os

pacientes foram randomizados para fazerem o controle local na semana 6 ou na 10. O grau de necrose foi de 33% x 44% respectivamente. Apesar desta diferença não houve influência na sobrevida, que foi de 78% e 73% em 5 anos.

6. Quimioterapia adjuvante (pós-operatória)

Imran et al. (2009) mostram, em uma análise retrospectiva, que o atraso do reinício da quimioterapia pós-operatória maior que 21 dias aumenta o risco de morte em pacientes com doença de extremidade localizada. A demora da cicatrização devida imunossupressão também poderia comprometer a intensidade de dose pós-operatória.

Baseado nas evidências de que resposta pobre implica em prognóstico pior foi tentado melhorar essa evolução modificando a quimioterapia pós-operatória. Para desapontamento ficou aparente que essa terapia de resgate não melhora o prognóstico (Winkler et al., 1988; Petrilli et al., 1991a).

A heterogeneidade das células do tumor primário e das metástases leva-nos a concluir que mudanças na terapia pós-operatória não são apropriadas.

Uma exceção questionável é o resgate com o uso de altas doses de Ifosfamida (Bacci et al., 2002a).

O POG e a Sociedade Francesa de Oncologia Pediátrica (SFOP) mostraram que a combinação de Etoposide e altas doses de Ifosfamida são efetivas para pacientes com osteossarcoma metastático, apesar da significativa mielossupressão e das complicações por infecção e toxicidade renal (Gentet et al., 1997; Goorin et al., 2002). Os protocolos SFOP OS 87 e OS 94 modificam as drogas adjuvantes conforme a resposta histológica, porém não mostram diferença na sobrevida (Mialou et al., 2005).

O EURAMOS indica o esquema quimioterápico MAP (metotrexate, doxorrubicina e cisplatina) para bons respondedores e o esquema MAPIE (metotrexate, doxorrubicina e cisplatina ifosfamida e etoposide) para maus respondedores

7. Quimioterapia neoadjuvante x adjuvante

Alguns estudos randomizados têm sugerido que não há diferença na sobrevida livre de doença entre cirurgia imediata seguida de quimioterapia adjuvante e protocolos de tratamento com quimioterapia neoadjuvante (Goorin et al., 1995)

O POG comparou a realização da quimioterapia neoadjuvante com a adjuvante em pacientes portadores de osteossarcoma não metastático e mostrou efetividade em ambos os grupos, com similar frequência de preservação de membros e sem vantagem de sobrevida livre de eventos (Goorin et al., 2003).

8. Quimioterapia intra-arterial

A cisplatina intra-arterial na artéria nutriente do tumor foi investigada por Jaffe et al. (1983). Estudaram também o uso de altas doses de metotrexate intra-arterial e concluíram que não existe vantagem terapêutica com o uso de altas doses sobre a via endovenosa. É esperado que a necrose tumoral seja maior em pacientes que recebem quimioterapia intra-arterial, mas as metástases não recebem a mesma dose citotóxica nem apresentam o mesmo grau de necrose que o tumor primário (Nachman et al., 1987).

No estudo do *Cooperative Osteosarcoma Study Group* - COSS 86 comparou-se cisplatina intra-arterial com cisplatina endovenosa associada à poliquimioterapia e

evidenciaram sobrevida livre de evento semelhante (Fuchs et al., 1998). Também não teve impacto na sobrevida global (Winkler et al., 1990).

Petrilli et al. (1999) testaram em uma janela terapêutica a atividade da carboplatina intra-arterial como monoterapia em 33 pacientes portadores de osteossarcoma e concluíram que este é um agente ativo.

9. Intensidade de dose

Meta-análises sugerem que a intensidade de dose é um importante fator determinante para a evolução favorável dos pacientes. Vários estudos têm mostrado o potencial de intensidade de dose associando a necrose tumoral e sobrevida livre de doença (Wensel e Kehr, 2008), porém o *European Osteosarcoma Intergroup* mostra que a quimioterapia intensificada aumenta a resposta histológica, mas não a sobrevida global e livre de doença (Lewis et al., 2007).

Smith et al. (1991) associaram a intensidade de dose da doxorubicina e a necrose tumoral, Delepine et al. (1996) relacionaram a intensidade de dose do metotrexate à sobrevida livre de doença e Wittig et al. (2002) associaram a quimioterapia de dose intensa com sobrevida livre de doença.

10. Altas doses de Ifosfamida

Altas doses de Ifosfamida têm se mostrado efetivo (Goorin et al., 2002). Lewis et al. (2000) não conseguiram reproduzir este benefício.

11. Altas doses de Metotrexate

O metotrexate, que é um antifolato específico para a fase S do ciclo celular, está entre os primeiros agentes a mostrar eficácia contra osteossarcoma. Ele bloqueia a ação da deidrofolato redutase. Para o tratamento do osteossarcoma é dado em doses que variam de 8 a 12 g/m² (Bacci et al., 1990; Jaffe e Gorlick, 2008). A toxicidade deve ser antagonizada pelo antídoto leucovorina, que é um folato ativado. O princípio é baseado no conceito que células normais podem ser resgatadas mais efetivamente do que células tumorais que têm menor transporte ativo de folatos (Delepine et al., 1996).

O desenvolvimento de insuficiência renal aguda mediada pela precipitação de metotrexate e seus metabólitos nos túbulos renais é uma complicação potencialmente ameaçadora da vida. Altas doses de Metotrexate induzem a disfunção renal em aproximadamente 1,8% dos pacientes com osteossarcoma que são tratados com protocolos clínicos e cuidados de suporte adequados (Widemann et al., 2004).

Guo et al. (1999) relatam que metástases de osteossarcoma podem ser resistentes a altas doses de methotrexate devido o aumento do carregador de folato redutase (RFC) nas células tumorais.

Tunn e Reichardt (2007) mostraram sobrevida similar entre protocolos incluindo ou não alta dose de metotrexate.

O MSKCC publica em 2008 que a administração de altas doses de MTX em pacientes ambulatoriais é factível e segura, sendo que aproximadamente metade dos pacientes requer modificação da dose de leucovorin baseado na monitorização dos níveis de MTX (Zelcer et al., 2008).

No estudo III GBTO foi usado um esquema de 3 drogas (Epirrubicina, Carboplatina e Ifosfamida) versus 6 ciclos de um esquema com as mesmas drogas

adicionados à metotrexate para pacientes portadores de tumores grandes. A adição de metotrexate não foi efetiva para resgatar os pacientes de mau prognóstico. Esse resultado contribuiu para outros estudos no Brasil.

A literatura sugere que estudos randomizados devem ser realizados, porém considera o metotrexate inadequado como agente único (Saeter et al., 1991; van Dalen e de Camargo, 2009).

12. Tratamento de resgate

Tabone et al. (1994) publicaram que o indicador prognóstico mais importante para a primeira recorrência é a completa ressecção da doença. Pacientes em que a cirurgia não é possível ou com segunda ou terceira recorrência tem prognóstico ruim. O benefício potencial de tratamento agressivo com altas doses de quimioterapia ainda precisa ser investigado (Fagioli et al., 2002).

13. Quimioterapia de altas doses com consolidação

Há pouca experiência de consolidação com terapia de altas doses, porém os resultados até o momento não evidenciaram benefícios (Meyers e Mackenzie 2004).

Sauerbrey et al. (2001) relatam que a utilização de altas doses de quimioterapia seguidas por transplante não melhora a sobrevida de pacientes com recaída, quando comparado com a terapia convencional.

Franzius et al. (2001) publicaram resultados promissores do uso de altas doses de Sm-153-EDTMP combinado com radiação externa e poliquimioterapia seguido por transplante autólogo de células periféricas, podendo retardar a progressão local de tumores irresssecáveis ou recaídos.

3.1.7.2 Cirurgia

A quimioterapia isolada é insuficiente para destruir o tumor primário (Jaffe et al., 2002), ou as metástases pulmonares radiologicamente detectáveis.

O controle local do osteossarcoma é sempre cirúrgico. O procedimento cirúrgico para remoção do tumor pode ser categorizado em intralesional, marginal, amplo ou radical. A remoção de todo o tumor sem deixar margens comprometidas é sempre necessária para evitar recorrência local.

Os procedimentos cirúrgicos dividem-se em duas grandes categorias: amputação e cirurgia conservadora, ambas incorporando o princípio básico da excisão em bloco do tumor, mantendo margens seguras.

O tratamento cirúrgico com efeito cosmético ou funcional não deve prejudicar a sobrevida em longo prazo. Dependendo do local primário, da situação anatômica, do grau de invasão tumoral deve ser indicado o melhor tipo de cirurgia (Meyers e Mackenzie 2004).

1. Cirurgia conservadora

A cirurgia conservadora consiste em preservar o membro, mantendo margens adequadas e sem comprometer a função do mesmo. É comumente realizada hoje em dia, em torno de 85% dos casos (Grimer, 2005). A sobrevida de pacientes submetidos à cirurgia conservadora é semelhante aos pacientes submetidos à amputação.

A presença de metástases não afeta o tipo de cirurgia escolhido. Alguns fatores podem afetar o tipo de cirurgia escolhido, como biópsia inadequada, envolvimento de estruturas vâsculo-nervosas, fraturas patológicas, obtenção de margens adequadas (Jesus-Garcia et al., 1996).

A margem cirúrgica deve ser de 1,0 cm em tumores metafisários, respeitando a placa de crescimento, e 3,0 cm a 5,0 cm se diafisários.

A maioria das reconstruções é feita com endopróteses metálicas que apresentam mínimas complicações como infecção, soltura, fratura e oferecem bons resultados funcionais, com deambulação precoce, estabilidade articular, sustentação do peso (Rubert et al., 1999).

2. Amputação

A indicação de cirurgia leva em conta a localização e extensão do tumor, idade e condições psicossociais do paciente. Quando efetuada a amputação, a reabilitação precoce e o apoio psicológico são elementos importantes no tratamento e na qualidade de vida (Refaat et al., 2002). Avanços na confecção de próteses têm melhorado muito o resultado funcional destes pacientes.

A conservação do membro não é apropriada em lesões com dificuldade de se obter uma margem de partes moles adequadas assim como tumores de extremidade inferior em crianças muito jovens que não alcançaram seu potencial de crescimento e que ficariam com assimetria posteriormente ao longo da vida.

Dessa forma, os pacientes com osteossarcoma devem ser tratados em centros especializados, capazes de oferecer acesso à equipe multidisciplinar, dentro de protocolos cooperativos prospectivos, interdisciplinares, eficazes e modernos.

O risco de uma amputação posterior a uma cirurgia conservadora com endoprótese é em torno de 9%, devido: recorrência local, infecção, falência mecânica e dor crônica.

Qualidade de vida em termos de função, resultados psicológicos e desfechos como casamento ou emprego aparentemente não diferem significativamente entre

sobreviventes de osteossarcoma amputados e não amputados. Entre os instrumentos disponíveis para avaliar os pacientes temos o “Quality of life – Cancer Specific” e o “TESS – *Toronto Extremity Salvage Score*”

3. Recorrência local

Osteossarcomas de extremidades apresentam índices ao redor de 5 a 10% de recorrência (Picci et al., 1994; Bacci et al., 2000; Bielack et al., 2002). Recorrência local está mais associada com resposta sub-ótima à quimioterapia e complicações da biópsia como hematoma e demora na cicatrização do que com margens cirúrgicas amplas (Picci et al., 1997). Scully et al. (2000) reportaram recorrência local em pacientes que apresentaram fraturas patológicas e foram tratados com cirurgia conservadora. Jesus-Garcia et al. (2000) mostraram que invasão de placa epifisária é o mais importante fator de risco para recaída local. Cassone et al. (1997) mostraram que a recidiva local alterou significativamente a sobrevida dos pacientes.

Pacientes tratados com margens cirúrgicas adequadas apresentam taxa de recorrência local de 3,1% e com margens inadequadas a taxa sobe para 23,8%. Da mesma forma, os que apresentam boa resposta aos esquemas quimioterápicos (grau de necrose maior 90%) apresentam taxa de recorrência local de 4% e os que apresentam má resposta aos esquemas quimioterápicos apresentam taxa de recorrência de 8%. Assim, na presença de margens adequadas e boa resposta histológica a quimioterapia a taxa de recorrência é de 3%. Já com margens inadequadas e má resposta histológica à quimioterapia, a taxa de recorrência sobe para 40%.

A recorrência local está associada a mau prognóstico, e pacientes com margens inadequadas devem ser reabordados cirurgicamente, principalmente se

forem maus respondedores. Recorrência local é associada a prognóstico reservado, sendo indicada segunda intervenção nos casos de margens inadequadas (Bacci et al., 1998).

3.1.7.3 Toracotomia

Pacientes com lesões pulmonares devem ser candidatos a metastasectomia em caso de apresentação de metástases precoces (ao diagnóstico), durante o tratamento ou tardias (após o término de tratamento).

A tomografia de tórax é o padrão ouro para diagnóstico de metástases pulmonares, porém ela subestima o número de nódulos. Kayton et al. (2006) mostram que, em um terço das tomografias que não apresentavam nódulos, foram evidenciados à palpação durante a toracotomia. Devido a essas evidências, o COSS preconiza a exploração contralateral mesmo na ausência de nódulos detectados no exame de imagem. Já o St. Jude mostra que não há aumento na sobrevida em fazer exploração contralateral em pacientes com metástases unilaterais (Karplus et al., 2009).

A ressecção dos nódulos tem sido correlacionada com aumento na sobrevida global bem como na sobrevida livre de doença (Bacci et al., 1997). Consiste no mais importante fator prognóstico na primeira recaída com sobrevida em 3-5 anos de 20-40% e após 5 anos de 23-31% (Dunn e Dehner, 1977; Merimsky et al., 2004).

Tem indicação quando existe controle do tumor primário, potencial para ressecção completa, reserva pulmonar suficiente. Em caso de doença bilateral pode ser indicada a toracotomia sincrônica, estagiada ou esternotomia.

A vídeotoracoscopia não é um bom método diagnóstico, pois mostra falha em 54% dos casos (Bielack et al., 2002).

Blasier et al. (1986) publicaram um relato de caso de um adolescente portador de osteossarcoma de tíbia submetido a 11 toracotomias num período de 2 anos e que se encontra livre de doença há 7 anos. Ressecção de todos os sítios identificados ao diagnóstico é essencial para a sobrevida, como demonstrado por diferentes grupos como o MSKCC (Meyers et al., 1993) e COSS (Kager et al., 2003), assim como pelo *Japanese Musculoskeletal Oncology Group* (Tsuchiya et al., 2002).

(1998) mostra que para pacientes portadores de metástases ao diagnóstico, ou que desenvolvem metástase depois de iniciado o tratamento, a sobrevida longa é possível, se a doença primária e metastática for totalmente removida. Diemel et al. (2009) concluíram em uma série com 1.800 pacientes que metastasectomia é mandatória para sobrevida em longo prazo, independente do número, localização das metástases ou tempo de aparecimento destas, assim como do número de cirurgias necessárias.

Briccoli et al. (2005) mostraram que em caso de aparecimento de metástases recorrentes antes de 2 anos de término de terapia, o tratamento preconizado é quimioterapia associada à metastasectomia; em recaídas após os 2 anos de toracotomia isolada ou associada à quimioterapia, não há diferença significativa na sobrevida.

3.1.7.4 Radioterapia

A experiência da radioterapia em osteossarcoma é limitada, devido diferentes razões: ser um tumor raro e o tratamento cirúrgico ser o de escolha, com altos índices de controles locais. Dúvidas existem quanto à eficácia e tolerância da radioterapia.

A radioterapia tem sido proposta como alternativa nos casos que não foram ressecados, como em lesões ocorrendo no esqueleto axial, base de crânio, cabeça e pescoço ou com cirurgias com margens exíguas ou positivas (Mahajan et al., 2008).

O controle local é maior nos pacientes que receberam doses maiores que 55 Gys e com doença microscópica. A sobrevida global nesses pacientes é melhor quando tratados com radioterapia no momento adequado do que nas recorrências (Delaney et al., 2007).

O uso da radioterapia paliativa aumenta a sobrevida, melhorando o controle local, o controle algico, principalmente quando usado combinado com quimioterápicos que agem como potencializadores, como Metotrexate, Adriamicina, Cisplatina e Gemcitabine (Machak et al., 2003).

3.1.7.5 Tratamento não cirúrgico de metástases pulmonares e extra-pulmonares

Alternativas não cirúrgicas como o uso de radioisótopos (¹⁵³ Samarium) (Anderson et al., 2002), crioablação, quimioterapia intracavitária, terapia com aerossóis com citoquinas (GMCSF) ou com quimioterapia (Gemcitabine) (Merimsky et al., 2000) são descritas para o tratamento de derrame pleural, lesão de parede torácica, lesão mediastinal e lesões recorrentes em pacientes com reserva pulmonar limitada, ou ainda em outras situações como metástases ósseas, hepáticas e cerebrais (Anderson et al., 2007).

3.1.7.6 Outros tratamentos

Outros tipos de tratamentos estão sendo estudados, incluindo inibidores da angiogênese e terapias biológicas.

1. Quimioterapia antiangiogênica ou metronômica

A angiogênese é definida como a construção de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, sendo um evento importante em condições fisiológicas e patológicas. A expansão tumoral é dependente da angiogênese, pois as células tumorais precisam de oxigênio e nutrientes. Esses fatores são produzidos nas células do estroma e células endoteliais, além das células tumorais. No crescimento do tumor, os fatores pró-angiogênicos estão presentes em sítio angiogênico e atuam estimulando as células vasculares endoteliais, através de receptores. Essas células adquirem características específicas para construir novos vasos. As células endoteliais são geneticamente estáveis, assim como as células tumorais. Acredita-se que as células endoteliais do tumor não são susceptíveis à aquisição de resistência a medicações.

A angiogênese é regulada por uma série de citocinas, incluindo fatores pró-angiogênicos que atuam no controle positivo, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), angiopoetina, fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento placenta-like (PIGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e interleucina 8 (IL8). Existem fatores que controlam de forma negativa esse processo que são denominados antiangiogênicos, como por exemplo, a angiostatina, endostatina, trombospondina e um inibidor de metaloproteinases tecidual (TIMP).

O tratamento metronômico consiste na administração frequente de quimioterápicos em doses menores que a máxima dose tolerada (MDT), sem intervalos prolongados entre as administrações. Pode ser visto como uma variação na dose intensidade com a exceção que a dose acumulada é menor que a MTD. Tem sido apresentada como uma estratégia promissora para o tratamento do câncer (Kerbel et al., 2000).

2. Imunoterapia

Refere-se à modulação do sistema imune para tratar doenças. Há vários tipos de imunoterapia: ativa e passiva. Agentes imunomoduladores como MTP-PE (Muramyl Tripeptide Phosphatidyl Ethanolamine), componentes da parede celular do BCG (Meyers et al., 2008) e IL2 (Interleucina 2), têm mostrado resultados promissores e evidências de resposta imune *in vitro*.

O *Children's Oncology Group* (COG) está investigando terapia com multiagentes quimioterápicos associados a Trastuzumab (*Herceptin*®), que é um anticorpo monoclonal recombinante contra a tirosinacina transmembrana HER-2. Também estão sob investigação peg Interferon, inibidores da mTOR, bifosfonados (ácido zoledrônico) associado com IGF 1 R (insulin like growth factor 1 receptor) e o Denosumab para recorrências.

O *St. Jude Children's Research Hospital* usa, no tratamento de primeira linha do osteossarcoma, a combinação de quimioterapia com terapia antiangiogênica usando bevacizumab (*Avastin*®), que é um anticorpo monoclonal humanizado contra o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

3. Experiência do Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento do Osteossarcoma (GCBTO)

O declínio da mortalidade das crianças portadoras de câncer foi mais acentuado na América do Norte, provavelmente devido ao início precoce dos grupos cooperativos com protocolos bem estruturados e atualizados. Em outras partes do mundo, esta integração e formação de grupos cooperativos ocorreram posteriormente. Na maioria dos países da Europa, a oncologia pediátrica foi

organizada durante a década de 70, mas em alguns países isso ocorreu décadas depois (Coebergh et al., 2001).

O primeiro ensaio clínico para osteossarcoma no Brasil iniciou-se em 1982 no Hospital A.C. Camargo de São Paulo, utilizando cisplatina intra-arterial pré-operatória seguida de cirurgia e manutenção com cisplatina e doxorrubicina. Foram estudados 92 pacientes apresentando sobrevida livre de eventos (SLE) de 44,1% e sobrevida global (SG) de 62,1% em 3 anos. Usando esse esquema terapêutico, 53,2% dos pacientes mostraram bom grau de necrose (maior 90%). Pacientes com tumor maior ou igual a 15 cm tiveram sobrevida 3 vezes menor (Petrilli et al., 1991a).

O estudo II iniciou-se em 1987 adicionando altas doses de metotrexato, cisplatina e doxorrubicina pré-operatório e randomização para os maus respondedores que passavam a receber ifosfamida. A sobrevida livre de eventos (SLE) foi de 65%. Identificaram-se fatores relevantes com valor prognóstico como: o tamanho do tumor, grau de necrose e tipo de cirurgia (Petrilli et al., 1991a).

O estudo III iniciou-se em 1991 e dividiu-se em braço de baixo e alto risco e utilizava pares de drogas como epirrubicina + carboplatina, ifosfamida + carboplatina, epirrubicina + ifosfamida para baixo risco, e altas doses de metotrexato para alto risco. Obteve 60% de cirurgias conservadoras e 14,5% de recidiva local. Identificou como fatores prognósticos a presença de metástase, o grau de necrose e o tamanho do tumor maior ou igual a 12 cm.

O estudo IV iniciou-se em 1996, estudou 113 pacientes onde foi introduzida uma nova associação de medicamentos, dando ênfase ao período pré-operatório e intensificação dos compostos platinados. Associadamente usou-se droga cardioprotetora dexrazoxane com a finalidade de cobrir os efeitos colaterais da infusão rápida da Doxorrubicina, ao invés da infusão de 72h. Testou-se também a

amifostina, droga citoprotetora, que foi utilizada para avaliação da capacidade de evitar efeitos nefro e ototóxicos da cisplatina. Teve 71% de cirurgias conservadoras e 14,1% de recidivas locais (Petrilli et al., 2002).

Em 2006 Petrilli et al. publicaram os resultados dos estudos III e IV analisados em conjunto com 209 pacientes e mostraram taxas de sobrevida em 5 e 10 anos menores que taxas reportadas na América do Norte e Europa. A sobrevida Global (SG) em 5 anos foi de 50,1% e a sobrevida livre de eventos (SLE) de 39%. Para os não metastáticos a SG foi 60,5% e a SLE de 45,5%. O padrão de doença avançada ao diagnóstico esteve presente, com alta incidência de metástases e tumores grandes.

O estudo V foi aberto em maio de 2000 e encerrada a inclusão de pacientes em dezembro de 2005, registrando 368 pacientes de 25 instituições. Utilizava altas doses de Ifosfamida, Cisplatina e Doxorrubicina. Apresentou 46,7% de tumores maiores que 12 cm, 38% de pacientes metastáticos, 65,2% de cirurgia conservadora e 10 % de recaída local, 37,6% de resposta histológica grau III e IV de Huvos e 48,3% de remissão completa (resultados ainda não publicados).

O GCBTO continua seus estudos. Atualmente formou-se um Grupo Latino (GLATO) com participação de instituições da Argentina e Uruguai. O GLATO 2006 tem como objetivo investigar o uso de metotrexate altas doses e o tratamento de manutenção de forma metronômica com ciclofosfamida e metotrexate após o protocolo convencional.

Na experiência isolada do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 1992 e 2000, com 50 pacientes, os principais fatores de impacto foram grau de necrose, presença de metástase e nível de DHL. A sobrevida global foi de 33% e entre os não metastáticos de 45% (Rech et al., 2004).

3.2 EZRIN

3.2.1 Introdução

Metástase é a principal causa de mortalidade em indivíduos com câncer. A identificação de proteínas que são importantes para esse processo é essencial.

Múltiplos fatores e mecanismos são envolvidos, incluindo fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, moléculas de adesão e fatores de angiogênese (Kim et al., 2002). Em 2004 dois grupos reportaram na revista *Nature Medicine* que ezrin é a chave do processo de metástases. Yu et al. (2004) usaram modelos de camundongos com rabdomiossarcoma para estabelecer linhagens de células metastáticas e Khanna et al. (2004) confirmaram que mantendo ezrin em sua conformação inativa há uma diminuição de metástases em osteossarcoma de camundongos.

3.2.2 Definição

Ezrin é uma proteína de ligação do citoesqueleto, ativamente envolvida no processo de metástase. Faz parte da família de proteínas ERM (Ezrin, Radixin e Moesin), é codificado pelo gene *cytovillin* ou *villin2* e é ainda um componente de estrutura de superfície celular que está envolvido na adesão da célula à matriz extracelular e interação célula-célula (Khanna et al., 2001).

3.2.3 Função

Exerce um papel estrutural positivo na manutenção da forma e polaridade da célula, bem como na participação na via de tráfico de membrana, migração da célula, sinalização, regulação do crescimento, e diferenciação. Está também envolvido

ativamente na biologia do desenvolvimento tumoral, especialmente na regulação do crescimento e capacidade de metastatizar (Tsukita e Yonemura, 1997) no desenvolvimento e progressão do tumor e na atividade reguladora celular, como sobrevida, e migração/invasão por complexos associados à membrana-citoesqueleto (Curto et al. 2004), motilidade do citoesqueleto, e angiogênese (Khanna et al., 2001).

Proteínas do complexo ERM têm redundantes funções, mas potencialmente padrão de expressão único. Se *ezrin* é crucial elemento em metástases similar função deveria ser esperada de outros membros da família, mas evidência disso para *radixina* e *moesina* não tem sido estabelecida (Bruce et al., 2007).

A ligação do *Ezrin* na membrana celular ao citoesqueleto de actina permite que a célula interaja diretamente com o microambiente e promova um andaime intracelular que facilita a transdução do sinal através do número de receptor do fator de crescimento e adesão das moléculas.

3.2.4 Fosforilação

Tem sido reportado que o gene *ezrin* está presente no citoplasma de forma inativa e depois da fosforilação assume a conformação ativa, move se para a membrana celular (Bretscher et al., 2002), conforme ilustra a Figura 3. Os sítios ativos na proteína são escondidos pela interação intramolecular entre os domínios N-terminal e C-terminal. Moléculas de ezrin são direcionadas para a membrana celular onde podem formar uma ponte entre F-actina e proteínas transmembrana. Um dos modos de ativação é através da interação com GTPase Rho, que controla o citoesqueleto de actina e regula atividades celulares.

A proteína ERM regula positivamente função Rho no “feedback” auto regulatório. Proteínas ERM ligam-se ao RhoGDI, um regulador negativo da

atividade Rho. Assim libera o Rho inativo, permitindo a mudança de GDP para GTP resultando na ativação do Rho. Super-expressão de ezrin resulta na amplificação da sinalização da via associada à Rho. Muitas moléculas associadas a metástases parecem participar na cascata de transdução de sinal na qual moléculas Rho são membros integrais. Desregulação da sinalização da cascata é crucial para disseminação tumoral (Hirao et al., 1996; Hunter, 2004).

Várias proteínas cinases têm sido descritas na fosforilação. PKC é responsável pela fosforilação de ezrin C-terminal threonine. A expectativa era de que altos níveis de ezrin fossem encontrados em todas as lesões e em todos os pontos durante o processo de metástase, que a expressão de ezrin fosforilado fosse igual e continuamente alta, porém não foi encontrado ezrin fosforilado em todos os estágios de progressão. O complexo ERM é fosforilado depois que as células chegam ao sítio secundário. Conforme as lesões progridem perdem a expressão de ERM fosforilado. A perda da fosforilação tardia no curso da progressão da metástase consiste num achado que sugere duas possibilidades: ou a fosforilação de ERM não é necessária durante o estágio de crescimento de metástase, ou a desfosforilação de ERM é necessária para a progressão (Brown et al., 2003). Contudo essas lesões crescem e quando grandes observamos uma re-expressão de ERM fosforilado apenas contra a face invasiva das lesões metastáticas. Ren et al. (2009) descrevem que a fosforilação é regulada dinamicamente durante o processo de metástase. Num modelo de células de osteossarcoma foi observada alta expressão de Ezrin fosforilado depois que chega ao pulmão. Surpreendentemente, alguns dias após essa fosforilação é perdida. Essa regulação esta ligada a ativação da PKC.

Fonte: Ivetic e Ridley (2004)

Figura 3 - Fosforilação e ativação do Ezrin.

3.2.5 Metastatização

Baseado nos achados dos estudos de “microarray” que mostram que Ezrin é expresso em linhagens de células altamente metastáticas, ele tem sido selecionado para estudos por inúmeros grupos. O exato papel do Ezrin ainda está sob investigação (Khanna et al., 2000).

Khanna et al. (2001) suprimiram a proteína Ezrin e isso significativamente diminuiu as metástases em camundongo, enquanto cultura de células não afetadas desenvolveram tumores *in vivo*. O mesmo efeito foi noticiado em estudos com rabdomiossarcoma, onde a supressão de Ezrin induziu a redução em metástases pulmonares em 10 vezes. Essa correlação sugere que ezrin deve ter papel similar em diversos sarcomas.

3.2.6 Vias de sinalização

A importância de Akt e MAPK, ambas vias de sinalização mediadas pelo ezrin, tem sido implicada na prevenção de anoikis e nos passos iniciais de metástases. Funcionam como uma via alternativa anti-apoptótica (Hunter, 2004). O grupo de Khanna investiga a relação entre Ezrin e essas cinases. Encontraram que a supressão de Ezrin leva à diminuição da fosforilação e a atividade cinase de ambos, contudo só a via MAPK parece estar associada a metástases (Hong et al., 2008). Outro grupo, contudo mostrou que Akt tem papel no osteossarcoma, associado com a secreção de MMP (matriz metaloproteinase). A supressão da secreção de MMP leva a drástica diminuição nas metástases.

Em adição, há outras vias que o ezrin está envolvido e que ajuda a promover a formação de metástases. O primeiro receptor descrito foi o CD44. É sabido que ezrin pode ligar-se à cauda do citoplasma do CD44 e essa interação pode promover metástase (Legg e Isacke, 1998; Yonemura et al., 1998).

3.2.7 Interações

Adicionalmente ezrin tem sido implicado no processo de metástase através de interações com HGFR (receptor do fator de crescimento do hepatócito) (Crepaldi et al., 1997), que é produto do gene *Met* e tem se mostrado envolvido na progressão do osteossarcoma em cachorros e humanos (Ma et al., 2003). Ezrin e HGFR tem se mostrado envolvidos na via MEK/ERK, que também envolve CD44 (Orian-Rousseau et al., 2002). As associações de Ezrin com CD44 e HGFR representam uma das complexas vias que o ezrin é regulador.

A ligação entre Ezrin e mTOR sugere que a via mTOR/S6K1/4E-BP1 seja uma importante via no comportamento metástase mediado pelo ezrin (Wang et al., 2005).

Pesquisas passadas têm indicado que integrinas têm papel complexo nas metástases, algumas mostram ser pró-metástase enquanto outras parecem inibir metástases. É sabido que ezrin rompe o processo de sinalização das integrinas e tem papel na sobrevivência durante o processo de metástase, contudo pouco ainda é entendido (Hunter, 2004).

É possível que haja uma ligação entre ezrin e Merlin. Merlin está intimamente ligado ao ERM e pertence ao subgrupo de proteína da família 4.1, que liga glicoproteína de superfície celular a actina do citoesqueleto. Merlin é um produto do gene supressor de tumor *NF2* e a perda desse gene leva a vários tumores em humanos (Curto et al., 2004). Embora haja poucas evidências que sugiram relação entre ezrin e Merlin a possibilidade permanece, pois os dois dividem localização subcelular, tem sócios comuns e interação física (Figura 4). O equilíbrio entre ezrin e merlin pode contribuir para o fenótipo metastático (Shapiro et al., 2006).

Ruptura da comunicação célula-célula normal também é importante no processo de metastatização. Gene *Brms1* está envolvido na formação do “gap” juncional intercelular.

O potencial de Ezrin para coordenar e amplificar o sinal de superfície celular associado à metástase e alterar o balanço da cascata intracelular sugere que ele serve de intermediário para muitas mudanças que são requeridas para a célula tumoral formar, com sucesso, a lesão secundária (Hunter, 2004).

Fonte: Hunter (2004).

Figura 4 - Interação do Ezrin com receptores de superfície celular, adesão celular e mecanismo de transdução de sinal.

3.2.8 Expressão

A proteína Ezrin é expressa em tumores epiteliais e mesenquimais. A maioria dos tecidos epiteliais normais apresenta alta expressão de Ezrin. Em contraste, tecido mesenquimal normal como músculo liso, músculo estriado e endotélio tem expressão relativamente baixa. Esses achados levam à hipótese que a relação entre expressão de Ezrin e um câncer específico poderia ser melhor definida pela comparação entre tecido tumoral e correspondente tecido normal (Nakamura e Ozawa, 1996).

Bruce et al. (2007) analisaram a proteína ezrin através de imunoistoquímica em 5.000 tecidos normais e de câncer humano, utilizando TMA. Foi feita comparação entre câncer e tecido normal correspondente e entre tumor de origem epitelial e mesenquimal. A proteína Ezrin foi expressa na maioria dos tecidos normais e com câncer, com variação do nível de intensidade. Em geral a expressão é maior em sarcomas do que em carcinomas. Pela normalização da expressão de Ezrin em cada câncer usando a expressão encontrada no tecido normal correspondente foram encontradas associações significantes em sarcomas.

Sung-Hyeok et al. (2008) mostraram que células fluorescentes com alta e baixa expressão de ezrin chegam ao pulmão, contudo a taxa de apoptose das células com alta expressão é significativamente menor que as células com baixa expressão. Esses dados sugerem que a sobrevida precoce das metástases associada com expressão de ezrin foi resultado de ezrin associado com inibição da apoptose de células tumorais que deixaram a vasculatura e chegaram ao pulmão.

Ezrin é expresso em altos níveis no intestino delgado, cólon, estômago, pulmão, pâncreas, mama, endométrio, córtex renal, placenta, próstata em níveis intermediários no baço, timo, linfonodos e medula óssea e em baixos níveis no coração, cérebro, fígado, tireóide, testículo e músculos (Akisawa et al., 1999).

3.2.9 Ezrin e outros tumores

Ezrin tem sido identificado como um fator prognóstico independente em várias neoplasias humanas. Há evidências de modelo animal e estudos humanos retrospectivos que a expressão do Ezrin correlaciona-se com progressão de tumor como rabdomiossarcoma, melanoma, carcinoma de pâncreas, cabeça e pescoço, ovário, esôfago e endométrio (Yu et al., 2004).

Akisawa et al. (1999) mostraram relação de altas expressões de ezrin em linhagens celulares humanas de adenocarcinoma pancreático com alto potencial metastático.

Elliott et al. (2005) mostraram que ezrin é necessário para a invasão e metástase das células do câncer mamário e que o bloqueio da função do ezrin pode representar uma nova e efetiva estratégia para prevenir metástases no câncer de mama. Sarrió et al. (2006) estudaram 509 carcinomas de mama usando TMA e concluiu que na maioria a coloração localizava-se no citoplasma (70,3%) e tinha associação positiva com características adversas do tumor.

Yan et al. (2007), Elzagheid et al. (2008) e Wang et al. (2009) demonstraram que ezrin está presente na maioria dos carcinomas colorretais primários esporádicos e está associada com fator prognóstico adverso. O aumento da expressão e a localização citoplasma e membrana está intimamente relacionada com invasão e metástases.

Bal et al. (2007) evidenciaram a correlação da expressão de ezrin com “status” do *H pylori* e sobrevida em portadores de carcinoma gástrico.

Weng et al. (2005) mostraram em pacientes portadores de sarcomas de partes moles associação significativa entre ezrin e morte por doença bem como sobrevida global, com desenvolvimento de metástases durante acompanhamento e correlação da expressão de ezrin com padrão de crescimento infiltrativo ultrapassando a cápsula.

Bretscher et al. (2002) demonstraram que a expressão do Ezrin promove vantagem na sobrevida precoce das células do câncer que atingem o pulmão. Deng et al. (2007) analisaram 9 genes em células de carcinoma de pulmão e identificaram PTHrP e Ezrin como reguladores de metástases.

Valdman et al. (2005) mostraram que ezrin está expresso na maioria dos tumores de próstata com prognóstico adverso, mas também observaram altos níveis de ezrin em metaplasia benigna do epitélio vesical e vesícula seminal.

Moilanen et al. (2003) encontraram em 440 amostras de carcinoma de ovário correlação de imunorreatividade de ezrin negativo ou fraco em carcinoma de ovário com mau prognóstico, em contraste com outras neoplasias como astrocitoma e melanoma.

A expressão de ezrin está correlacionada com sobrevida global em análise uni e multivariada para pacientes portadores de carcinoma ovariano e endometrióide. (Kobel et al. 2006a e b).

Ornek et al. (2008) compararam endométrio normal de mulheres sem endometriose e endométrio eutópico e ectópico de mulheres com endometriose e mostraram altos níveis de Ezrin total e ezrin fosforilado nos tecidos de mulheres com endometriose ($p < 0,05$) concluindo que este pode ser um potencial marcador para invasão celular endometrial, podendo ter papel na sua patogênese.

Makitie et al. (2001) concluíram que a presença de imunorreatividade de ezrin em melanoma uveal maligno é associada com alta mortalidade ($p: 0,018$). Já Ilmonen et al. (2005) examinaram a expressão de ezrin em 95 melanomas cutâneos primários e correlacionou com fatores prognósticos convencionais e biomarcadores. Mostrou pior comportamento clínico em pacientes com ezrin positivo, mas a diferença não foi significativa ($p: 0,190$).

Geiger et al. (2000) propuseram que ezrin pode ser uma arma para distinguir oligodendroglioma de astrocitomas e diferentes graus de tumores astrocíticos, mostrando fraca coloração em astrócitos normais, moderada em astrocitomas

anaplásicos e forte em glioblastomas. Tynninen et al. (2004) demonstraram altas expressão de ezrin em gliomas primários e recorrentes.

Já Osawa et al. (2009) usaram a técnica de imunofluorescência em linhagens de meduloblastoma com Ezrin superexpresso e mostraram a promoção de invasão *in vitro*.

Bohling et al. (1996) mostraram expressão citoplasmática difusa de ezrin em células estromais de hemangioblastoma.

3.2.10 Ezrin e Osteossarcoma

O gene *Ezrin* pode estar envolvido na iniciação e/ou transformação das células do osteossarcoma. Ezrin tem se mostrado promissor em várias neoplasias, contudo na correlação com prognóstico do osteossarcoma são poucas as publicações. Há uma pobreza de relatos clínicos levando em consideração a expressão do Ezrin e a correlação com prognóstico do osteossarcoma (Kim et al., 2007).

A expressão da proteína Ezrin no osteossarcoma é mais alta que tecido ósseo normal, que tem baixa expressão de proteína Ezrin (Bruce et al., 2007).

Para mostrar a relevância do Ezrin, Khanna et al. (2001) examinaram “tissue micro arrays” (TMA) com amostras ósseas caninas e humanos incluindo tecidos normais, tumores primários e metástases. Amostras caninas mostraram Ezrin mais altos em amostras de metástases do que nas de tumores primários e sobrevida mais curta em tumores primários com Ezrin expresso. Nas amostras humanas Ezrin estava presente em 100% dos pacientes metastáticos ao diagnóstico e 62,5% nos não metastáticos. Consistente com esses dados foi encontrado associação significativa entre altas expressões de Ezrin e prognóstico ruim em osteossarcoma pediátrico (Khanna et al., 2004).

A expressão de Ezrin é elevada em osteossarcoma de alto grau quando comparado com o baixo grau. Um grupo encontrou que 43,75% de osteossarcoma de alto grau expressam níveis elevados de ezrin enquanto nenhum de baixo grau expressou e que a expressão aumenta durante o processo de progressão tumoral (Park et al. 2006). Outro grupo ligou altos níveis de Ezrin no tumor primário com intervalo livre de doença significativamente mais curto em cães quando comparado a cães com osteossarcoma e níveis baixos de Ezrin (Khanna et al., 2004). Esse grupo também encontrou ligação de amostras pediátricas com osteossarcoma apendicular localizado e risco de recaída 80% maior para portadores de níveis elevados de Ezrin. Isso sugere que Ezrin pode ser um biomarcador da progressão do osteossarcoma e especificamente a imunorreatividade de Ezrin pode ser uma arma viável, contudo não se tem certeza se altos níveis contribuem diretamente para metástases ou se isso indica que apenas a célula responde a estímulos externos.

Park et al. (2009) pesquisaram a expressão de Ezrin no osteossarcoma de mandíbula e não acharam significância estatística quanto a idade, sexo, localização, tipo histológico e ploidia tumoral, nem prognóstico.

Khanna et al. (2004) dividiram seus pacientes em grupos de alta e baixa expressão de acordo com o escore calculado pela intensidade e proporção de imunorreatividade de Ezrin. Eles mostraram diferença na sobrevida livre de metástases entre esses grupos. Kim et al. (2007) aplicaram análise similar, mas não observaram diferença na sobrevida entre esses grupos de pacientes.

A imunorreatividade de ezrin no osteossarcoma pode ser vista no citoplasma das células (C+) ou no citoplasma e membrana, considerado difuso (D+) e interpretada de forma semi-quantitativa, similar ao descrito para os receptores de estrogênio para câncer de mama (Kim et al., 2007). Park et al. (2006) mostraram

coloração imunoistoquímica presente no citoplasma das células de osteossarcoma, especialmente no citoplasma próximo à membrana e imunorreatividade ausente no estroma de células benignas. É possível que a imunorreatividade observada difusamente no citoplasma e na membrana possa ser associada a comportamento biológico mais agressivo. Ferrari et al. (2008) mostraram pior prognóstico em pacientes com esse padrão difuso de imunorreatividade.

Ogino et al. (2007) analisaram 4 espécimes de tecido fresco de osteossarcoma, 3 linhagens de células de osteossarcoma humano e demonstraram altas expressões do nível de ezrin em metastáticos.

Salas et al. (2009) sugeriram o uso de imunoistoquímica Ezrin como arma para diagnóstico diferencial entre osteossarcoma condroblástico e condrossarcoma convencional com 100% de especificidade.

Baseado nessas pesquisas de ezrin com metástases em osteossarcoma novas drogas como a rapamicina ou análogos como o inibidor do ciclo celular 779 (CCI-779) são reportadas como inibidor de metástase Ezrin mediada e podem ser consideradas no regime quimioterápico. Sua propriedade anticâncer é atribuída à inibição da via de sinalização *mTOR*, com controle da translação do RNAm e da proliferação celular, levando a inibição da metástase pulmonar experimental *in vivo* (Wan et al., 2005). Guba et al. (2002) demonstraram a habilidade da rapamicina de inibir o crescimento metastático do tumor e a angiogênese *in vivo* em modelos animais.

3.3 CD44

3.3.1 Introdução

Essa molécula é conhecida por ter sido a primeira proteína de superfície na qual se demonstrou interação com as proteínas do complexo ERM (Lesley et al., 1993; Tsukita et al., 1994). Forma um complexo que exerce diversos papéis em células normais e particularmente nas células do câncer (Martin et al., 2003).

Foi originalmente reconhecida em linfócitos e células hematopoéticas e facilita a recirculação de linfócitos após a adesão ao endotélio.

3.3.2 Definição

CD44 é uma família de glicoproteínas de superfície celular onde o ácido hialurônico funciona como um de seus ligantes. Está amplamente distribuído e é um componente comum da matriz extracelular e dos fluídos extracelulares. Conhecida como *Homing Cellular Adhesion Molecule* - H-CAM e ligante da matriz extracelular, está também implicada em invasividade e metástases. Tem papel na migração da célula e é conhecido por induzir a sinalização intracelular (Martin et al., 2003).

3.3.3 Função

É sabido que esta proteína está envolvida na interação célula-célula e célula-matriz e exerce um papel importante na geração do tumor, crescimento, invasão e metástase.

O CD44 não é uma molécula única, mas uma família de moléculas geradas pela alternância de múltiplos exons de um gene único e pela diferente modificação

pós-translacional em diferentes tipos de células. Não está claro como essas modificações influem na função de ligação-interação. O significado de múltiplas isoformas variantes (CD44v3, v4, v5, v6, v7, v9 e v10) não é entendido (Lesley et al., 1993). O tipo mais comum de CD44 é o padrão ou variante hematopoético (CD44s ou CD44H).

3.3.4 Metastatização

Associação de algumas isoformas com potencial metastático tem sido observada em inúmeros tumores (Kuryu et al., 1999).

3.3.5 Vias de expressão

A Figura 4 mostra que E-caderina é uma molécula de adesão conhecida por regular negativamente a atividade do CD44 e suprime a invasão mediada por CD44, juntamente com a β catenina (Tsukita e Yonemura, 1994). E-caderina é importante porque é um regulador negativo da atividade do CD44 e pode suprimir a invasão mediada pelo CD44. A perda da função de E-caderina tem mostrado aumento na disseminação metastática e tem sugerido que a superexpressão de ezrin funciona como substituto da perda de E-caderina (Yu et al., 2004).

Superexpressão de ezrin rompe o equilíbrio normal de sinalização celular e amplifica sinais pró-metástases como CD44 ou receptor *Met*. O gene *Met*, receptor do fator de crescimento do hepatócito, tem sido previamente implicado na progressão do osteossarcoma canino e humano, bem como outros cânceres (Ma et al., 2003). O gene *merlin* compete com complexo ezrin-CD44. A perda de merlin seria equivalente à autorregulação de ezrin.

3.3.6 Interação

Zohar et al. (2000) evidenciaram em seu estudo que a osteopontina existe como componente integral do complexo ácido hialurônico-CD44-ERM e que este está envolvido na migração dos fibroblastos, ativação dos macrófagos e células metastáticas.

3.3.7 Expressão

Tem sido observado em células normais, como linfócitos, células mielóides, fibroblastos, células epiteliais, musculares, retinianos, e células da glia. Há algumas controvérsias quanto à coloração imunoistoquímica nos osteoclastos e osteócitos.

3.3.8 CD44 e outros tumores

A superexpressão de CD44 e algumas isoformas variantes são vistas como marcadores de comportamento agressivo, conferindo potencial metastático em inúmeros tumores, como linfoma, glioma, tumor colorretal, estômago, mama, bexiga, pulmão e colo de útero (Kim et al., 2002).

Matsumura e Tarin (1992) e Tanabe et al. (1993) mostraram aumento da expressão de CD44 em tecidos neoplásicos de carcinoma de cólon comparado com tecidos normais. Herlich et al. (1995) e Pals et al. (1998) publicaram que a expressão de CD44v6 é um fator prognóstico independente que tem valor para identificar pacientes com câncer colorretal propensos a desenvolver metástases à distância.

Ristamak et al. (1998) evidenciaram que a expressão de CD44 está fortemente associada a pior prognóstico em linfoma não Hodgkin e Niitsu e Iijima (2002) mostraram que o CD44 é um fator prognóstico independente em análise multivariada de uma amostra de 216 pacientes com essa patologia.

Joensuu et al. (1993) mostraram associação de CD44 com carcinoma ductal de mama.

Gotoda et al. (2000) concluíram que CD44v2 é um marcador prognóstico em pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de esôfago.

Kabin et al. (2006) concluíram que a expressão de CD44 pode ser considerada como parâmetro prognóstico em carcinoma renal.

Humphrey et al. (1999) avaliaram o papel da isoforma padrão de CD44 como preditor do comportamento clínico do rabdomiossarcoma e concluíram que a expressão deste marcador correlaciona-se diretamente com prognóstico.

Mathew et al. (1996) avaliaram 27 carcinomas hepatocelular e encontraram significância na correlação entre a expressão de CD44 e presença de invasão vascular, mas não com o grau do tumor ou índice de proliferação.

Em certos tumores como neuroblastoma, próstata, GIST (tumor gástrico estromal) a perda do CD44 confere transformação para o fenótipo invaso devido à perda da inibição do contacto através da perda da ligação da proteína do complexo ERM (Martin et al., 2003).

Combaret et al. (1995) recomendam o uso de CD44 como um marcador biológico adicional em neuroblastoma estágio inicial.

Montgomery et al. (2004) mostraram que a perda de CD44c é um marcador prognóstico em tumor gástrico estromal.

Clarke et al. (1995) concluíram que em adenocarcinoma de pulmão a perda de expressão de CD44 é associada com pior prognóstico e pode indicar neoplasia mais agressiva, servindo, portanto como marcador prognóstico. Assimakopoulos et al. (2002) tiveram resultado semelhante em relação a carcinoma espinocelular (CEC) de cabeça e pescoço, ou seja, a redução da expressão de CD44 confere vantagem no

crescimento e nas propriedades malignas das células tumorais. Kanke et al. (2000) mostraram que a expressão do CD44v6 pode ser usada como marcador biológico para determinar o grau de malignidade do CEC de cabeça e pescoço porque a perda ou a disfunção dessa variante está envolvida na aquisição da habilidade de invasão das células tumorais.

A redução de CD44 está relacionada com pior prognóstico em melanoma cutâneo estágio I, como demonstraram Karjalainen et al. (2000).

Roa Estério et al. (2001) não mostraram diferença na sobrevida quando observaram tumores de vesícula biliar com ausência de expressão de CD44.

3.3.9 CD44 e Osteossarcoma

O valor prognóstico da forma padrão CD44 (CD44H) ou variantes em osteossarcoma permanece controverso (Weber al., 2002).

Kim et al. (2002) referem que o CD44v5 confere comportamento astático ao osteossarcoma, já Kuryu et al. (1999) investigaram a expressão de CD44H e CD44v3, v4, v5, v6, v7, v9 e v10 e na análise multivariada mostraram que a expressão de CD44v6 é relacionada a pior prognóstico em pacientes com osteossarcoma.

Peng et al. (2002) publicaram um artigo que analisa a expressão de CD44, MMP-9 e Ki-67 através de técnica imunoistoquímica e a relação entre esses marcadores e invasão, metástases e recorrência em casos de osteossarcoma. Conclui-se que o aumento na expressão dos marcadores CD44, MMP-9 e KI-67 está envolvido com o aumento da invasão, que a diferenciação das células tumorais está ligada a altos níveis de CD44 e MMP-9 e que a presença de metástase precoce está relacionada à presença de CD44.

3.4 COMPLEXO EZRIN-CD44

3.4.1 Introdução

Ezrin interage diretamente com a cauda do citoplasma do produto do gene *CD44*, que está implicado em metástases em vários estudos (Vaheri et al., 1997), como ilustrado na Figura 5.

Fonte: Morrison et al. (2010)

Figura 5 - Complexo Ezrin-CD44.

3.4.2 Complexo Ezrin-CD44 e outros tumores

Chai et al. (2007) publicaram um artigo onde referem que a expressão de ezrin-CD44v6 tem valor prognóstico no carcinoma espinho celular (CEC) do esôfago, mostrando que a expressão do complexo Ezrin-CD44 é maior nos casos com linfonodos positivos que nos casos negativos.

Harrison et al. (2002) concluíram que CD44 e ezrin interagem no endotélio celular do câncer de próstata e localizam-se em áreas de contacto do tumor. O complexo ezrin-CD44 tem papel essencial na invasão das células endoteliais pelas células do câncer de próstata.

3.4.3 Complexo Ezrin-CD44 e Osteossarcoma

Peng et al. (2002) relataram que o aumento na expressão de CD44 potencialmente leva a um aumento funcional da ativação do Ezrin e está correlacionado com aumento da invasão do osteossarcoma.

Kim et al. (2009) avaliaram o espécime cirúrgico de 70 pacientes portadores de osteossarcoma não metastático através de imunoistoquímica e associaram com parâmetros clínico. Concluíram que 55,7% dos pacientes expressaram ezrin e que a imunorreatividade é um fator prognóstico negativo para sobrevida.

Xu-Dong et al. (2009) avaliaram a expressão de ezrin, CD44 e Six1 através de RT-PCR em 32 amostras de osteossarcoma, 10 amostras de tecido normal e linhagem celular de osteossarcoma e concluíram que apenas o Ezrin pode ser considerado fator prognóstico e preditivo de metástases pulmonares.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA DE SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram selecionados inicialmente os registros de 68 pacientes para o estudo. Após avaliação dos prontuários, 52 permaneceram elegíveis para análise. Os demais foram excluídos por não serem virgens de tratamento.

O seguimento dos pacientes variou de 9 a 69 meses com média de 28,2 meses e mediana de 27,4 meses. Inicialmente descreveremos a população total atendida em nosso serviço com a finalidade de demonstrar as características dessa população.

4.1.1 Caracterização dos pacientes, segundo variável sócio-demográfica

Na amostra de 52 pacientes, observa-se distribuição homogênea entre sexos. Quarenta e nove pacientes foram considerados brancos.

A idade variou entre 7 e 25 anos incompletos, com média de 15,9 anos e mediana de 15,1 anos. Cinquenta e seis por cento dos pacientes eram provenientes do estado de São Paulo, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Frequência absoluta e relativa de 52 pacientes portadores de Osteossarcoma segundo variáveis sócio-demográficas. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	nº	%
Raça	Branco	49	94,2
	Não branco	3	5,8
Sexo	Masculino	27	52,0
	Feminino	25	48,0
Procedência	SP	29	55,8
	Outros	23	44,2
Idade	Até 10 anos	10	19,2
	Acima de 10 anos	42	80,8
Total		52	100,0

4.1.2 Caracterização dos pacientes, segundo variável clínica-laboratorial e de tratamento

Em 65% dos pacientes (34/52) o tempo de queixa foi até 3 meses, com média de 4,7 meses e mediana de 2,5 meses, variando de 1 a 60 meses

Quarenta e seis por cento (24/52) dos pacientes eram metastáticos ao diagnóstico, sendo 2 metastáticos também para ossos e pulmão.

Dos 24 pacientes com laudo radiológico de nódulos pulmonares ao diagnóstico 16 (67%) não foram submetidos à toracotomia.

Quinze pacientes apresentavam nível sérico de DHL normal (menor 450 UI/l) e 19,2 % maior 1.000 UI/l. O nível médio foi de 678,2 UI/l e mediana de 552,0 UI/l. Em cinco prontuários não foi possível resgatar o valor de DHL ao diagnóstico.

O tratamento instituído foi, na sua maioria, o Protocolo do GBTO 2000 (43/52). Outro protocolo utilizado durante o período 2003-2004 foi o CCG 9754 que tem como diferença fundamental o uso de MTX 12 g/m². Uma paciente não fez quimioterapia por ser portador de osteossarcoma parosteal.

O tratamento cirúrgico foi conservador em 57,7% (30/52). Todos tinham laudo anatomopatológico mostrando margem cirúrgica adequada. Nove pacientes não foram submetidos à cirurgia por diversas causas. Dois pacientes foram submetidos à cirurgia sem quimioterapia neoadjuvante.

Com a quimioterapia neoadjuvante 53,8% dos pacientes apresentaram má resposta histológica (grau de necrose I e II segundo Huvos). Dez pacientes não tinham avaliação de resposta histológica pós-quimioterapia. Tabela 2

Tabela 2 – Frequência absoluta e relativa de 52 pacientes portadores de Osteossarcoma segundo variável clínica-laboratorial e de tratamento. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	nº	%
Tempo de queixa	< 3 meses	34	65,4
	>= 3meses	18	34,6
Metástase	Não	28	53,8
	Pulmão	22	42,3
	Pulmão + osso	2	3,8
DHL*	<1.000	37	71,2
	> = 1.000	10	19,2
	Sem dosagem	5	9,6
Tipo de protocolo**	GBTO 2000	43	82,7
	CCG 9754	8	15,4
	Não fez QT	1	1,9
Tipo de cirurgia***	Amputação	13	25,0
	Conservadora	30	57,7
	Sem cirurgia	9	17,3
Toracotomia	Não	36	69,2
	Sim	16	30,8
Grau Huvos****	I e II	28	53,8
	III e IV	14	26,9
	Sem avaliação	10	19,3
Total		52	100,0

* 5 pacientes não tem dosagem de DHL ao diagnóstico

** 1 paciente não fez quimioterapia

*** 9 pacientes não foram submetidos à cirurgia do tumor primário

**** 10 pacientes não tem avaliação do grau de Huvos

4.1.3 Caracterização dos pacientes, segundo variável relacionada ao tumor.

Os sítios mais comuns de localização do tumor foram fêmur (33/52), úmero (8/52) e tíbia (6/52). Apenas 3 eram axiais (pélvicos).

O tipo histológico foi clássico em 46/52. Todos os tumores eram de alto grau, com exceção de 1 parosteal.

Dezenove pacientes apresentaram-se com tumores grandes, isto é, lesão tumoral maior ou igual a 15 cm no exame de radiografia simples realizado ao diagnóstico.

Um paciente não foi possível resgatar o exame radiológico inicial, nem o laudo com medidas do tumor. Tabela 3

Tabela 3 – Frequência absoluta e relativa de 52 pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis relacionadas ao tumor. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	nº	%
Tipo histológico	Clássico	46	88,5
	Outros	6	11,5
Tamanho*	< 15 cm	32	61,5
	> =15 cm	19	36,5
	Sem medida	1	2,0
Localização Do tumor	Fêmur	33	63,5
	Outros	19	36,5
Total		52	100,0

* 1 paciente não tem medida do tumor no exame de diagnóstico

4.1.4 Caracterização dos pacientes, segundo variável relacionada à evolução

Vinte e dois pacientes apresentaram recaída após término de tratamento, sendo que 72% dos pacientes (16/22) tiveram recaída precoce e 8 pacientes (15,3%)

com recaída local. Destes 5 (62,5%) apresentaram recidiva precoce. Nenhum tinha exame anatomopatológico mostrando margem cirúrgica marginal ou intralesional.

Dezesseis pacientes apresentaram progressão imagenológica ou clínica em vigência de tratamento. Todos foram excluídos do protocolo em uso e trocado para tratamento de resgate, porém nenhum com sucesso.

Dezessete pacientes encontram-se fora de terapia, sendo 13 pacientes não metastáticos e 4 metastáticos ao diagnóstico no laudo tomográfico.

Sessenta e um por cento dos pacientes (32/52) evoluíram a óbito, sendo 31 óbitos devido a acometimento pulmonar do osteossarcoma, evoluindo a insuficiência respiratória e 1 por outra causa. Nenhum paciente faleceu por toxicidade secundária ao tratamento nem por infecção.

Um paciente abandonou o tratamento por questões religiosas e encontra-se perdido de seguimento. Tabela 4

Tabela 4 – Frequência absoluta e relativa de 52 pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis relacionadas à evolução dos pacientes. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	nº	%
Recaída	Não	30	57,7
	Sim	22	42,3
Progressão	Não	36	69,2
	Sim	16	30,8
Status	Vivo com doença	2	3,8
	Vivo sem doença	17	32,7
	Óbito pela doença	31	59,7
	Óbito por outra causa	1	1,9
	Abandono	1	1,9
Óbito	Não	20	38,5
	Sim	32	61,5
Total		52	100,0

4.1.5 Associações entre características

Evidenciamos associação entre idade e tempo de queixa. Cem por cento dos pacientes com mais de 3 meses de queixa apresentavam-se ao diagnóstico com idade superior a 10 anos, conforme mostra a Tabela 5

Tabela 5 – Associação entre dados sócio-demográficos e tempo de queixa de 52 pacientes portadores de osteossarcoma. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Tempo de queixa		p♦
		< 3meses n (%)	> 3meses n (%)	
Idade	Até 10 anos	10 (100,0)	0 (0,0)	0,010
	Acima 10 anos	24 (57,1)	18 (42,9)	
Total		34 (65,3)	18 (34,7)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

Evidenciamos associação entre idade e presença de metástases, devendo ressaltar que dos 24 pacientes com metástases ao diagnóstico apenas um encontrava-se na primeira década. Tabela 6

Tabela 6 – Associação entre dados sócio-demográficos e presença de metástase de 52 pacientes portadores de osteossarcoma. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Metástase		p♦
		Não n (%)	Sim n (%)	
Idade	Até 10 anos	9 (90,0)	1 (10,0)	0,014
	Acima 10 anos	19 (45,2)	23 (54,8)	
Total		28 (53,8)	24 (46,2)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

4.1.5.1 Associação entre características do clínico, laboratorial e tratamento e características do tumor

Em nossa amostra não evidenciamos associação do tamanho tumoral com tempo de queixa, nível de DHL, presença de metástase, tipo de cirurgia, quimiossensibilidade. Tabela 7.

Tabela 7 – Associação entre tamanho do tumor e variáveis clínica-laboratoriais, de tratamento de 51 pacientes portadores de osteossarcoma. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Tamanho do tumor		p♦
		< 15 cm	> = 15 cm	
Tempo de Queixa	< 3 meses	21 (63,6)	12 (36,3)	0,859
	> = 3 meses	11 (61,1)	7 (38,9)	
DHL*	< 1.000	20 (55,5)	16 (44,5)	0,274
	> = 1.000	8 (80,0)	2 (20,0)	
Presença de Metástase	Não	17 (63,0)	10 (37,0)	0,973
	Sim	15 (62,5)	9 (37,5)	
Cirurgia***	Amputação	8 (61,5)	5 (38,4)	0,925
	Conservadora	18 (60,0)	12 (40,0)	
Grau Huvos****	I e II	17 (60,7)	11 (39,3)	0,824
	III e IV	8 (57,1)	6 (42,9)	
Total		32 (62,7)	19 (37,3)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

* 5 pacientes não tem dosagem de DHL ao diagnóstico

** 1 paciente não fez protocolo de quimioterapia

*** 9 pacientes não foram submetidos à cirurgia do tumor primário

**** 10 pacientes não tem avaliação do grau de Huvos

4.1.5.2 Associação entre tamanho do tumor e tempo de queixa

Em nossa amostra não demonstramos associação entre tempo de queixa e tamanho do tumor. Gráfico 1

Gráfico 1 – Correlação entre as médias do tamanho do tumor e tempo de queixa em meses.

4.1.5.3 Associação entre tamanho do tumor e presença de metástases

Em nossa amostra não demonstramos associação entre tamanho do tumor e presença de metástases. Gráfico 2

Gráfico 2 – Correlação entre a média da presença de metástase e tamanho do tumor

4.1.5.4 Associação entre presença de metástase e demais características clínico, laboratorial e tratamento

Em nossa amostra não demonstramos associação entre presença de metástases com tempo de queixa, grau de Huvos, nível sérico de DHL, protocolo de tratamento, toracotomia.

Mostramos associação do tipo de cirurgia com a presença de metástases, porém devemos ressaltar que entre pacientes metastáticos foi indicado cirurgia conservadora e amputação em iguais proporções. Tabela 8

Tabela 8 – Associação entre presença de metástase e demais características clínico, laboratorial e tratamento de 52 pacientes portadores de osteossarcoma. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Presença de metástase		p♦
		Não	Sim	
Tempo de Queixa	< 3 meses	19 (55,8)	15 (44,2)	0,686
	> = 3 meses	9 (50,0)	9 (50,0)	
Cirurgia***	Amputação	4 (30,7)	9 (69,3)	0,016
	Conservadora	22 (73,3)	8 (26,7)	
Grau Huvos****	I e II	16 (57,1)	12 (42,9)	0,657
	III e IV	9 (64,2)	5 (35,8)	
DHL *	< 1000	22 (59,4)	15 (40,6)	0,098
	> = 1000	3 (30,0)	7 (70,0)	
Total		28 (53,8)	24 (46,2)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

* 5 pacientes não têm dosagem de DHL ao diagnóstico

** 1 paciente não fez protocolo de quimioterapia

*** 9 pacientes não foram submetidos à cirurgia do tumor primário

**** 10 pacientes não têm avaliação do grau de Huvos

4.1.5.5 Associação entre presença de metástases e tempo de queixa

Em nossa amostra não demonstramos associação entre tempo de queixa e presença de metástases. Gráfico 3

Há dois casos esparsos: 1 com 60 meses de queixa no grupo que não possui metástase (não evidenciado no gráfico) e um entre o 10º e 15º mês.

Gráfico 3 – Correlação entre a média da presença de metástase e tempo de queixa em meses.

Portanto não evidenciamos relação no atraso diagnóstico a tumores de grande volume nem com presença de metástases.

4.1.6 Análise de sobrevida

4.1.6.1 Sobrevida global pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo variáveis sócio-demográficas

Quando fizemos a análise da sobrevida, evidenciamos que em nossa amostra o sexo influenciou significativamente na sobrevida, sendo que o sexo masculino apresentou uma probabilidade menor de sobrevida em 5 anos em relação ao sexo feminino (22,2% x 37,0 ; $p=0,013$).

As demais variáveis não apresentaram significância estatística para a sobrevida. Tabela 9

Tabela 9 - Probabilidade de sobrevida global acumulada para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variável sócio-demográfica. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida (%)					p♦
		Nº casos	Nº óbitos	1 ano	3 anos	5 anos	
Sexo	Masculino	27	21	81,5	22,2	22,2	0,013
	Feminino	25	11	96,0	63,5	37,0	
Raça	Branco	49	31	87,5	39,1	25,6	0,334
	Não branco	3	1	66,7	66,7	66,7	
Idade	Até 10 anos	10	5	100	55,6	27,8	0,357
	Acima 10 anos	42	27	85,5	37,7	30,2	
Procedência	SP	29	16	89,7	47,9	36,0	0,494
	Outros	23	16	87,0	32,8	24,6	

♦p teste de log-rank

4.1.6.2 Sobrevida global pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo características do tumor

Em nossa amostra nenhuma característica do tumor influenciou significativamente na sobrevida. Tabela 10

Tabela 10 - Probabilidade de sobrevida global acumulada para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo características do tumor. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida (%)					p♦
		Nº casos	Nº óbitos	1 ano	3 anos	5 anos	
Histologia	Clássico	46	29	86,7	40,2	24,7	0,327
	Outros	6	3	100,0	50,0	50,0	
Localização	Fêmur	33	21	90,5	36,4	20,2	0,573
	Outros	19	11	84,2	47,4	40,6	
Tamanho	< 15 cm	32	18	87,5	49,0	35,3	0,204
	>= 15 cm	19	13	89,2	28,5	19,0	
Tamanho (mediana)	< 12,5 cm	25	13	88,0	54,8	35,9	0,115
	> = 12,5 cm	26	18	88,3	28,8	23,1	

♦p teste de log-rank

4.1.6.3 Sobrevida global pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo variáveis clínico-laboratoriais e tratamento

Nenhuma das características clínico-laboratorial e de tratamento influenciou significativamente na sobrevida, exceto pela mediana do nível sérico de DHL ($p=0,019$) e a presença de metástases ($p=0,004$).

Devemos ressaltar que o grau de Huvos mostrou apenas tendência de influência na sobrevida ($p=0,073$) conforme ilustrado na Tabela 11

Tabela 11 - Probabilidade de sobrevida global acumulada para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis clínico-laboratorial e tratamento. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida (%)					
		Nºcasos	Nº óbitos	1 ano	3 anos	5 anos	p♦
Tempo de Queixa	< 3 meses	34	19	91,2	43,2	34,5	0,595
	≥ 3 meses	18	13	83,3	38,1	25,4	
DHL	< 1.000	37	22	88,8	38,3	33,5	0,372
	≥ 1.000	10	8	80,0	26,7	13,3	
Metástase	Não	28	14	96,3	54,2	39,1	0,004
	Sim	24	18	78,8	25,5	17,0	
Protocolo	GBTO 2000	43	26	88,2	38,8	34,9	0,827
	CCG	8	6	87,5	43,7	14,6	
Cirurgia	Amputação	13	10	92,3	38,5	12,8	0,152
	Conservadora	30	15	93,2	49,3	43,8	
Huvos	I e II	28	20	89,1	37,2	21,7	0,073
	III e IV	14	5	100	58,9	xx	
Toracotomia	Não	36	17	88,7	51,6	46,9	0,008
	Sim	16	15	87,5	18,8	xx	

♦p teste de log-rank

xx não completou tempo seguimento

4.2 CASUÍSTICA ANALISADA

Após avaliação dos 52 prontuários foram selecionados os blocos de parafina. Verificou-se que 34 blocos estavam disponíveis e constituíram a amostra para análise final.

Dentre os motivos que levaram a redução do número de pacientes inicialmente selecionados e amostra final tivemos: Falta do bloco de parafina da biópsia e falta de material suficiente para realização de novos cortes para estudo imunoistoquímica. A seguir demonstraremos as características da população selecionada para a realização do nosso estudo. Faremos uma comparação das

características da população selecionada com o grupo dos pacientes excluídos com a finalidade de demonstrar que não houve viés com a população do estudo.

4.2.1 Características sócio-demográficas

Setenta por cento da amostra eram do sexo masculino, sessenta e cinco por cento dos pacientes era da raça branca, sessenta e sete por cento (28/34) dos pacientes tinha mais que 10 anos de idade ao diagnóstico e cinquenta e cinco por cento deles eram provenientes do estado de São Paulo. Tabela 12

Tabela 12 – Descrição das características sócio-demográficas dos pacientes avaliados no estudo imunoistoquímico e dos pacientes excluídos. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Grupo análise		p♦
		Sem bloco (18 pacientes) n (%)	Com bloco (34 pacientes) n (%)	
Sexo	Masculino	08 (29,7)	19 (70,3)	0,432
	Feminino	10 (40,0)	15 (60,0)	
Raça	Branco	17 (34,7)	32 (65,3)	1,000
	Não branco	01 (33,4)	02 (66,6)	
Idade em Décadas	Até 10 anos	04 (40,0)	06 (60,0)	0,723
	Acima 10 anos	14 (33,3)	28 (66,7)	
Procedência	SP	10 (34,4)	19 (65,6)	0,982
	Outros	08 (34,8)	15 (65,2)	
Total		18 (34,6)	34 (65,4)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

4.2.2 Variáveis relacionadas ao tumor

O sítio mais comum de localização do tumor foi fêmur (22/34).

Setenta e três por cento dos pacientes tinham tumores grandes (com 15 cm ou mais), medido na radiografia simples realizada ao diagnóstico.

O tipo histológico clássico ou convencional estava presente em 30/34. Tabela 13.

Tabela 13 – Descrição das características do tumor dos pacientes avaliados no estudo imunoistoquímico e dos pacientes excluídos. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Grupo análise		p♦
		Sem bloco (18 pacientes) n (%)	Com bloco (34 pacientes) n (%)	
Localização	Fêmur	11 (33,3)	22 (66,7)	0,798
	Outros	7 (36,8)	12 (63,2)	
Tamanho do Tumor	< 15 cm	12 (37,5)	20 (62,5)	0,543
	≥ 15 cm	05 (26,3)	14 (73,7)	
Tipo Histológico	Clássico	16 (34,7)	30 (65,3)	1,000
	Outros	02 (33,3)	04 (66,7)	
Total		18 (34,6)	34 (65,4)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

4.2.3 Variáveis clínica-laboratorial e de tratamento

Sessenta e dois por cento dos pacientes tinha menos que três meses de queixa.

Seis pacientes apresentavam DHL maior 1.000 mg/dl e cinquenta e quatro por cento (13/34) dos pacientes eram metastáticos ao diagnóstico.

O tratamento instituído foi, na sua maioria, o Protocolo do GBTO 2000 (28/34). Sessenta e três por cento dos pacientes recebeu tratamento cirúrgico conservador (19/34).

Com a quimioterapia neoadjuvante, 68% dos pacientes apresentou má resposta histológica (grau de necrose I e II segundo Huvos).

Onze pacientes foram submetidas à toracotomia. Tabela 14.

Tabela 14 - Descrição das características clínico-laboratoriais e tratamento dos pacientes avaliados no estudo imunoistoquímico e dos pacientes excluídos. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Grupo análise		p♦
		Sem bloco (18 pacientes) n (%)	Com bloco (34 pacientes) n (%)	
Tempo de Queixa	< 3 meses	13 (38,2)	21 (61,8)	0,548
	> = 3 meses	05 (27,8)	13 (72,2)	
DHL *	< 1000	11 (29,7)	26 (70,3)	0,704
	> = 1000	04 (40,0)	06 (60,0)	
Presença de Metástase	Não	07 (25,0)	21 (75,0)	0,115
	Sim	11 (45,8)	13 (54,2)	
Cirurgia**	Amputação	03 (23,0)	10 (77,0)	0,491
	Conservadora	11 (36,6)	19 (63,4)	
Tipo de *** Protocolo	Brasileiro	15 (34,8)	28 (65,2)	0,703
	CCG	2 (25,0)	06 (75,0)	
Grau Huvos****	I e II	09 (32,1)	19 (67,9)	1,000
	III e IV	4 (28,5)	10 (71,5)	
Toracotomia	Não	13 (36,1)	23 (63,9)	1,000
	Sim	05 (31,2)	11 (68,8)	
Total		18 (34,6)	34 (65,4)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

* 5 pacientes não tem dosagem de DHL ao diagnóstico

** 1 paciente não fez protocolo de quimioterapia

*** 9 pacientes não foram submetidos à cirurgia do tumor primário

**** 10 pacientes não tem avaliação do grau de Huvos

4.2.4 Variáveis relacionadas à evolução dos pacientes

Metade (17/34) dos pacientes apresentou recaída, sendo 3 pacientes com recaída local. Dezesseis tiveram recaída precoce. Vinte e um pacientes evoluíram a óbito. Tabela 15.

Tabela 15 – Descrição da evolução dos pacientes avaliados no estudo imunoistoquímico e dos pacientes excluídos. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Grupo análise		p♦
		Sem bloco (18 pacientes) n (%)	Com bloco (34 pacientes) n (%)	
Recaída	Não	13 (43,3)	17 (56,7)	0,150
	Sim	5 (22,7)	17 (77,3)	
Total		18 (34,6)	34 (65,4)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

4.3 MÉTODOS

Trata-se de um estudo retrospectivo cujas variáveis clínicas e epidemiológicas estudadas foram obtidas por meio de revisão de prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico (SAME) do HCB. Os dados coletados foram registrados em uma ficha previamente definida (ANEXO I). A partir disto foram separados lâminas e blocos de parafina arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica da Instituição e selecionados os mais representativos.

4.3.1 Variáveis estudados para caracterização da população e para análise do objetivo

4.3.1.1 Dados epidemiológicos

As características sócio-demográficas foram coletadas a partir de uma ficha cadastral, padrão da instituição, aplicada no momento do registro do paciente no hospital. Essa ficha consta:

- A) Sexo: masculino e feminino;
- B) Raça: branca e não branca, de acordo com as informações do paciente e/ou responsável, no momento do cadastro (Pereira, 1995);
- C) Idade: foi estratificada em 2 grupos: menor de 10 anos e maior ou igual a 10 anos conforme McKenna et al. (1965) e Lee et al. (2007).

4.3.1.2 Dados clínicos e laboratoriais

A avaliação clínica foi extraída da anamnese onde foram checados tempo de história, exame físico geral e exame locorregional.

Foram obtidas informações sobre:

- A) tempo de história - foi o tempo da queixa referida pelo paciente e/ou responsável que o levou a procurar o médico, categorizado em menor que 3 meses ou maior e igual a 3 meses, conforme a publicação do GBTO III e IV;
- B) sítio primário - foi classificado como fêmur (sítio com maior incidência) e outros;
- C) dosagem sérica de DHL ao diagnóstico. O padrão de normalidade do nosso laboratório é 240 a 480 U /l. Foi categorizado entre maior ou menor de 1.000 U/l, conforme Rech et al. (2004). No estudo MIOS nível sérico de DHL acima do normal estava relacionado com falência terapêutica (Link et al.,

1991), assim como Bacci et al. (2004), mostrando que níveis acima do valor de referência 240U/l têm valor prognóstico.

4.3.1.3 Extensão da doença

Os pacientes foram submetidos a exames de estadiamento recomendados (tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética para avaliação locorregional e tomografia de tórax e cintilografia óssea para descartar doença disseminada). A suspeita clínica foi confirmada por biópsia

- A) Metastático ou não: considerado como doença localizada quando não havia metástase a distância de acordo com as informações clínicas e imagenológicas descritas no prontuário;
- B) Tamanho do tumor: se refere ao maior eixo medido na radiografia simples de diagnóstico. Todas as imagens foram revisadas por uma radiologista da Instituição (LF). Optamos por classificar e categorizar o tumor em menor e maior ou igual a 15 cm, conforme Petrilli et al. (1991a) mostraram no GBTO II ser uma variável prognóstica.

4.3.1.4 Tratamento

Os dados sobre tratamento realizado incluíram:

- A) tipo de cirurgia (amputação ou conservadora): a cirurgia era considerada conservadora quando se preservava o membro afetado e amputação quando o membro era ressecado;
- B) protocolo de tratamento quimioterápico: os pacientes foram submetidos aos protocolos de quimioterapia vigentes durante este período na Instituição e divididos em:

- período de 2000 a 2002 e 2005 a 2006: GBTO 2000 que incluía Ifosfamida, Cisplatina e Doxorubicina;
- período de 2003 a 2004: CCG 9754 que incluía Ifosfamida, Cisplatina e Doxorubicina associado à altas doses de Methotrexate (ANEXO II).

4.3.1.5 Evolução dos pacientes

O acompanhamento dos pacientes deu-se em consultas regulares de acordo com as normas reconhecidas dos protocolos vigentes. Foram avaliados quanto progressão ou recaída.

Avaliamos os pacientes quanto:

- A) recaída que se divide em precoce, aquela que ocorreu em menos de 1 ano de término de terapia ou tardia, aquela que ocorreu com mais de 1 ano de término de terapia e ainda se foi local ou à distância;
- B) progressão da doença em vigência de tratamento, que foi considerado aumento de pelo menos 20% da medida da lesão ou aparecimento de uma ou mais lesões;
- C) O status do paciente foi definido como:
 - vivo com doença,
 - vivo sem doença,
 - óbito por doença ou complicação do tratamento,
 - óbito por outra causa e perdido de seguimento no momento do levantamento (foram considerados os pacientes que não compareceram as consultas ou sem informações por um período superior a duas vezes o estipulado para retorno)

Nas referências acima, levou-se em consideração a última data de acompanhamento descrita no prontuário, até dezembro de 2008.

4.3.1.6 Análise histológica

O material de biópsia foi fixado em formalina 10% e incluído em parafina. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina (HE). Todos os pacientes biopsiados em outras instituições tiveram suas lâminas submetidas à revisão anátomo-patológica e os blocos solicitados para novos cortes. Nos casos de material pouco elucidativa nova biópsia foi realizada.

A avaliação do tipo histológico, da margem cirúrgica e do grau de resposta à quimioterapia na peça cirúrgica foi extraída dos laudos anatomopatológicos do prontuário.

A) Grupo histológico: Classificado conforme a OMS entre clássico e outros - teleangiectásico, pequenas células, baixo grau, parosteal, periosteal, alto grau, secundário, extra-ósseo, multicêntrico (Raymond et al., 2002).

As peças cirúrgicas foram fixadas em solução de formalina 10% e a resposta histológica determinada pelo grau de necrose após a quimioterapia conforme escala de Huvos Ayala:

B) Grau de necrose

Grau I – pequeno ou nenhum efeito quimioterápico

Grau II – até 50% de necrose tumoral. Presença de tumor viável.

Grau III – até 90% de necrose tumoral. Presença de focos tumorais viáveis.

Grau IV – nenhuma célula tumoral é encontrada.

Foram considerados maus respondedores os graus I e II e bons respondedores os com mais de 90% de necrose, ou seja, os graus III e IV (Raymond et al., 1987).

4.3.1.7 Construção das lâminas

Foram revisadas as lâminas da biópsia para confirmação diagnóstica e determinação do local mais representativo no bloco para novos cortes. Nas lâminas examinadas o componente tumoral foi identificado e marcado. Nos casos em que a marcação imunoistoquímica apresentou falha ou não foi possível avaliar fragmento representativo do tumor foi considerado não avaliável.

Baseando-se nesta marcação as lâminas de imunoistoquímicas foram construídas pelo patologista (FAS) no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo.

Os blocos de parafina referentes à biópsia sem tratamento prévio foram submetidos a novos cortes de 3 mm e montadas novas lâminas previamente tratadas com 3 aminopropil-trietoxi-silano (Sigma).

A leitura foi realizada no Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos por 2 diferentes patologistas da Instituição (SCMS e CRV), em separado, de modo duplo-cego, sem conhecimento de detalhes clínicos. Alguma discrepância foi resolvida em reunião de consenso. Tal leitura foi feita empregando o microscópio óptico Nikon eclipse E200 com ocular CFW 10x e objetiva 10.

Os resultados foram avaliados de forma tradicional, sendo considerado positivo o depósito acastanhado. A avaliação foi qualitativa, considerando-se positivas as células que apresentavam coloração acastanhada, com variação de tonalidade no núcleo ou na membrana e semiquantitativa conforme número de células coradas.

Para essa análise quantitativa, as células positivas foram contadas somente em áreas com alta proporção de representatividade de células tumorais, enquanto áreas de necrose e/ou infiltrado de linfócitos foram excluídas para regulamentar.

4.3.1.8 Leitura e avaliação da imunoreatividade da proteína Ezrin de acordo com escala semiquantitativa, baseada nos seguintes critérios

1. se expressão positiva ou negativa

Ezrin + (E+) - positivo

Ezrin – (E-) - negativo

2. nos casos de expressão positiva foi analisado a localização, conforme descrito por Ferrari et al. (2008).

Membrana e citoplasma – difuso (D+)

Citoplasma (C+)

3. foram analisados quanto à proporção de células coradas e divididas em grupos como proposto por Ferrari et al. (2008).

1+ = 1-25% das células positivas,

2+ = 26-50% das células positivas,

3+ = 51-75% das células positivas,

4+ = 76-100% das células positivas

4. e quanto a intensidade de coloração (Kim et al., 2008).

1+ = fraca intensidade

2+ = moderada intensidade

3+ = forte intensidade

Na tentativa de identificar pacientes de risco categorizamos os resultados anteriores conforme o escore proposto por Kim et al. (2008) que pontua a proporção de células coradas e intensidade de coloração e dividido em grupos:

1-4 = baixa expressão

5-7 = alta expressão

Kim et al. (2008) também tentaram identificar os pacientes de alto risco com a criação de 4 grupos de acordo com a interação de positividade de ezrin e resposta histológica de quimioterapia pré-operatória

1. Ezrin positivo e pobre respondedor
2. Ezrin positivo e bom respondedor
3. Ezrin negativo e pobre respondedor
4. Ezrin negativo e bom respondedor

4.3.1.9 Leitura da imunoexpressão da proteína CD 44 conforme

1. expressão positiva ou negativa

CD44 + - positivo

CD44 – - negativo

2. a localização:

CD44 + Membrana e citoplasma – considerado difuso (D+)

Citoplasma (C+)

3. conforme a avaliação da imunorreatividade de acordo com escala semiquantitativa, baseada nos critérios propostos por Kim et al. (2008) que se baseia na proporção de células coradas:

negativo = até 10% das células positivas,

intermediário = 1+ = 10-50% das células positivas,

alto = 2+ = > 50% das células positivas

4.3.2 Protocolo de Reações Imunoistoquímicas

As reações analisadas foram realizadas com controle interno e estão descritas conforme protocolo anexo. ANEXO III.

4.3.3 Processamento e análise dos dados

Os dados obtidos nos prontuários foram registrados em uma ficha padronizada, digitada e arquivada em um banco de dados com auxílio do programa “*Excel for Windows*”.

Selecionamos a casuística que tínhamos informação, convocamos todos os pacientes que não tínhamos informação sobre o acompanhamento. Para a análise da sobrevida utilizamos as informações até dezembro de 2008.

4.3.3.1 Análise Estatística

Após a coleta dos dados os mesmos foram registrados em um banco de dados utilizando o software *Windows Statistical Package for Social Science (SPSS)* versão 17.0. As variáveis foram distribuídas em categorias.

A associação entre as variáveis foi realizada usando o teste de quiquadrado.

4.3.3.2 Análise da Sobrevida

Na análise da sobrevida, o óbito foi considerado o evento final.

Sobrevida global (SG) foi definida como o período da admissão até a avaliação mais recente de acompanhamento ou óbito.

Sobrevida livre de doença (SLD) foi definida como o período da admissão até a recaída.

Sobrevida livre de progressão (SLP) foi definida como o período da admissão até a progressão.

O cálculo dos estimadores da probabilidade de sobrevida foi realizado pelo técnica de Kaplan e Meier (1958) e as comparações entre as curvas foi realizado pelo teste de *log rank*.

Para análise da sobrevida livre de eventos (SLE) foram considerados como eventos o óbito, a recaída e progressão da doença. O tempo até o evento foi o tempo entre a data da admissão até a data do óbito, da recaída ou da progressão da doença.

O intervalo de confiança de 95% e o valor do $p < 0,05$ foi considerado significativo.

***ANÁLISE DE RISCO E
ASPECTOS ÉTICOS***

5 ANÁLISE DE RISCO E ASPECTOS ÉTICOS

Por se tratar de estudo retrospectivo, não há a participação direta de pacientes, nem introdução de qualquer modificação terapêutica ou aplicação de método que possa gerar danos, benefícios ou outras consequências a qualquer paciente. Desta forma não foi necessária à adoção de consentimento pós-informado.

Foram utilizados dados de prontuários e material arquivado em blocos de parafina após aprovação pelos responsáveis de cada departamento. O uso de material parafinado não acarretou prejuízo aos pacientes, pois a terapêutica necessária já havia sido instituída.

O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos e da Universidade de São Paulo (USP-SP) e foi aprovado e protocolado. ANEXO IV

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 ANALISE DOS CASOS SEGUNDO ESTUDO IMUNOISQUIMICO

6.1.1 Segundo variáveis relacionadas ao estudo imunoistoquímico Ezrin

Setenta e seis por cento dos pacientes apresentaram Ezrin positivo, sendo que em 41% dos casos a proporção de células coradas variou entre 76 a 100%. Em 20/34 (58,9%) a coloração mostrou-se de forte intensidade.

A localização da coloração mostrou-se semelhante entre citoplasma e membrana (38,2%).

Entre os pacientes com coloração para Ezrin positivo foi realizado o escore, que admite pontos para porcentagem de células coradas e a intensidade de coloração.

Cinquenta por cento dos pacientes apresentaram escore com alta expressão para proteína Ezrin. Tabela 16

Tabela 16 – Frequência absoluta e relativa de 34 pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis relacionadas a estudo imunoistoquímico Ezrin. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	nº	%
Ezrin	Negativo	8	23,5
	Positivo	26	76,5
Ezrin	negativo	8	23,5
	Moderada	6	17,6
	Intensa	20	58,9
Ezrin	Negativo	8	23,5
	Citoplasmático	13	38,2
	Membrana	13	38,2
Ezrin	Negativo	8	23,5
	1 a 25 %	4	11,8
	26 a 50 %	5	14,7
	51 a 75 %	3	8,8
	76 a 100%	14	41,2
Escore	negativo	8	23,5
	1-4 (baixa expressão)	9	26,5
	5-7 (alta expressão)	17	50,0
Total		34	100,0

* 8 amostras negativas, nenhuma com fraca intensidade.

Figura 6 – Fotomicrografia de osteossarcoma convencional com ezrin negativo (aumento 400 X).

Figura 7 - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional com ezrin positivo citoplasma (aumento 400 X)

Figura 8 - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional com ezrin positivo membrana (aumento 400 X)

6.1.2 Segundo variáveis relacionadas ao estudo imunoistoquímico CD44

Cinquenta por cento dos pacientes apresentaram CD44 positivo, sendo que em vinte por cento dos casos a proporção de células coradas variou entre 51 a 100%.

Em apenas nove por cento a coloração mostrou-se de forte intensidade. Tabela 17

A localização da coloração mostrou-se 38,2% em citoplasma (Figura 9) e 12% localizada na membrana (Figura 10).

Tabela 17 – Frequência absoluta e relativa de 34 pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis relacionadas a estudo imunoistoquímico CD44. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	nº	%
CD44	Negativo	17	50,0
	Positivo	17	50,0
CD44	Negativo	17	50,0
	Fraca	7	20,5
	Moderada	7	20,5
	Intensa	3	9,0
CD44	Negativo	17	50,0
	Citoplasmático	13	38,2
	Membrana	4	11,8
CD44	Negativo (até 10%)	17	50,0
	Até 50%	10	29,4
	Até 100%	7	20,6
Total		34	100

* 17 casos negativos

Figura 9 - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional com cd44 positivo citoplasma (aumento 400 X).

Figura 10 - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional com cd44 positivo membrana (aumento 400 X).

6.1.3 Segundo variáveis relacionadas ao estudo do complexo ezrin-CD44

Em 14 casos apenas a coloração evidenciou Ezrin e CD 44 positiva concomitantemente. Tabela 18

Tabela 18 – Associação entre imunorreatividade de ezrin e CD44. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	CD44 positivo n (%)	CD44 negativo n (%)	p♦
Ezrin positivo	14 (53,8)	12 (46,2)	0,688
Ezrin negativo	3 (37,5)	5 (62,5)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

6.2 Associação da imunorreatividade entre características sócio-demográficas, clínico-laboratorial e tratamento, características do tumor com imunorreatividade da proteína Ezrin e CD44.

6.2.1 Associação entre características sócio-demográficas com imunorreatividade da proteína Ezrin

Não demonstramos associação entre características sócio-demográficas com imunorreatividade da proteína Ezrin. Tabela 19.

Tabela 19 – Associação entre as variáveis sócio-demográficas com imunorreatividade da proteína Ezrin. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Ezrin		p♦
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Sexo	Masculino	4 (21,0)	15 (79,0)	1,000
	Feminino	4 (26,7)	11 (73,3)	
Cor	Branca	7 (21,8)	25 (78,2)	0,421
	Não branca	1 (50,0)	1 (50,0)	
Idade	Até 10 anos	1 (16,7)	5 (83,3)	1,000
	Acima 10 anos	7 (25,0)	21 (75,0)	
Total		8 (23,5)	26 (76,5)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

6.2.2 Associação entre características do tumor com imunorreatividade da proteína Ezrin

Em nossa amostra não demonstramos associação entre características do tumor com imunorreatividade da proteína Ezrin. Tabela 20

Tabela 20 - Associação entre as características do tumor com imunorreatividade da proteína Ezrin. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Ezrin		p♦
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Histologia	Clássico	7 (23,3)	23 (76,7)	1,000
	Outros	1 (25,0)	3 (75,0)	
Tamanho do Tumor	< 15 cm	7 (35,0)	13 (65,0)	0,102
	≥ 15 cm	1 (7,2)	13 (92,8)	
Localização do Tumor	Fêmur	4 (18,2)	18 (81,8)	0,410
	Outros	4 (33,3)	8 (66,7)	
Total		8 (23,5)	26 (76,5)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

6.2.3 Associação entre características clínico-laboratorial e tratamento com imunorreatividade da proteína Ezrin

Não houve associação entre características clínico-laboratorial e de tratamento com imunorreatividade da proteína Ezrin, exceto tipo de cirurgia com Ezrin. Tabela 21

Tabela 21 - Associação entre as variáveis clínico-laboratoriais e tratamento com imunorreatividade da proteína Ezrin. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Ezrin		p♦
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Tempo de Queixa	< 3 meses	5 (23,8)	16 (76,2)	1,000
	> = 3 meses	3 (23,0)	10 (77,0)	
DHL *	< 1000	6 (23,0)	20 (77,0)	0,564
	> = 1000	0 (0,0)	6 (100,0)	
Presença de Metástase	Não	4 (19,0)	17 (81,0)	0,679
	Sim	4 (30,7)	9 (69,3)	
Protocolo	Osteo 2000	5 (17,8)	23 (82,2)	0,126
	CCG	3 (50,0)	3 (50,0)	
Tipo de Cirurgia**	Amputação	5 (50,0)	5 (50,0)	0,030
	Conservadora	2 (10,5)	17 (89,5)	
Toracotomia	Não	5 (21,7)	18 (78,3)	1,000
	Sim	3 (27,2)	8 (72,8)	
Grau Huvos***	I e II	6 (31,5)	13 (68,5)	0,367
	III e IV	1 (10,0)	9 (90,0)	
Total		8 (23,5)	26 (76,5)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

* 2 pacientes não tem dosagem de DHL ao diagnóstico

** 5 pacientes não foram submetidos à cirurgia do tumor primário

*** 5 pacientes não tem avaliação do grau de Huvos

6.2.4 Associação entre características sócio-demográficas com imunorreatividade da proteína CD44

Não demonstramos em nossa amostra associação entre características sócio-demográficas com imunorreatividade da proteína CD44. Tabela 22

Tabela 22 - Associação entre as variáveis sócio-demográficas com imunorreatividade da proteína CD44. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	CD44		p♦
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Sexo	Masculino	8 (42,1)	11 (57,9)	0,300
	Feminino	9 (60,0)	6 (40,0)	
Idade	Até 10 anos	5 (83,3)	1 (16,7)	0,175
	Acima 10 anos	12 (42,8)	16 (57,2)	
Raça	Branca	16 (50,0)	16 (50,0)	1,000
	Não branca	1 (50,0)	1 (50,0)	
Total		17 (50,0)	17 (50,0)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

6.2.5 Associação entre características do tumor com imunorreatividade da proteína CD44

Em nossa amostra, não demonstramos associação entre características do tumor com imunorreatividade da proteína CD44. Tabela 23

Tabela 23 - Associação entre as características do tumor com imunorreatividade da proteína CD44. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	CD44		p♦
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Histologia	Clássico	14 (46,6)	16 (53,4)	0,601
	Outros	3 (75,0)	1 (25,0)	
Tamanho do Tumor	< 15 cm	8 (40,0)	12 (60,0)	0,163
	>= 15 cm	9 (64,2)	5 (35,8)	
Localização do Tumor	Fêmur	12 (54,5)	10 (45,5)	0,473
	Outros	5 (41,6)	7 (58,4)	
Total		17 (50,0)	17 (50,0)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

6.2.6 Associação entre características clínico-laboratorial e tratamento com imunorreatividade da proteína CD44

Não houve associação entre características clínico-laboratorial e de tratamento com imunorreatividade da proteína CD44. Tabela 24

Tabela 24 - Associação entre as variáveis clínico-laboratorial e tratamento com imunorreatividade da proteína CD44. Departamento de Pediatria, Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	CD44		p♦
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Tempo de Queixa	< 3 meses	13 (61,9)	8 (38,0)	0,157
	≥ 3 meses	4 (30,7)	9 (69,3)	
DHL *	< 1000	13 (50,0)	13 (50,0)	1,000
	≥ 1000	3 (50,0)	3 (50,0)	
Presença de Metástase	Não	9 (42,8)	12 (57,2)	0,290
	Sim	8 (61,5)	5 (38,5)	
Protocolo	Osteo 2000	13 (46,4)	15 (53,6)	0,656
	CCG	4 (66,7)	2 (33,3)	
Tipo de Cirurgia**	Amputação	7 (70,0)	3 (30,0)	0,128
	Conservadora	7 (36,8)	12 (63,2)	
Toracotomia	Não	12 (52,1)	11 (47,9)	1,000
	Sim	5 (45,4)	6 (54,6)	
Grau Huvos***	I e II	9 (47,3)	10 (52,7)	0,893
	III e IV	5 (50,0)	5 (50,0)	
Total		17 (50,0)	17 (50,0)	

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

* 2 pacientes não tem dosagem de DHL ao diagnóstico

** 5 pacientes não foram submetidos à cirurgia do tumor primário

*** 5 pacientes não tem avaliação do grau de Huvos

6.3 SOBREVIDA PELO ESTIMADOR DO PRODUTO LIMITE DE KAPLAN MEIER

6.3.1 Segundo variáveis de imunorreatividade da proteína Ezrin

Não demonstramos diferença na sobrevida global em relação à imunorreatividade da proteína Ezrin. O escore também não mostrou nenhuma influência na sobrevida. Tabela 25

Tabela 25 - Probabilidade de sobrevida global acumulada para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis de imunorreatividade da proteína Ezrin. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida (%)					p♦
		Nº eventos	Nº óbitos	1 ano	3 anos	5 anos	
Ezrin	Negativo	8	4	100,0	62,5	41,7	0,120
	Positivo	26	18	83,9	32,0	12,8	
Ezrin	Negativo	8	4	100,0	62,5	41,7	0,557
	Moderada	6	5	83,3	20,8	xx	
	Intensa	20	13	84,4	35,2	xx	
Ezrin	Negativo	8	4	100	62,5	41,7	0,197
	Citoplasma	13	8	75,5	40,3	xx	
	Difuso	13	10	92,3	25,2	xx	
Ezrin	Negativo	8	4	100	57,1	57,1	0,251
	1 a 25%	4	3	80,0	40,0	xx	
	26 a 50%	5	5	60,0	20,0	xx	
	51 a 75%	3	3	100,0	33,3	xx	
	76 a 100%	14	7	92,9	40,5	xx	
Ezrin	1-4 (baixa expressão)	9	6	71,4	21,4	xx	0,558
	5-7 (alta expressão)	17	12	88,8	34,5	xx	

♦p teste de log-rank

xx não completou tempo seguimento

6.3.2 Sobrevida pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo interações de Ezrin com resposta histológica à quimioterapia em pacientes não metastáticos

Quando aplicamos a categorização de risco descrita Kim et al. (2008) usando a interação de Ezrin com resposta histológica à quimioterapia demonstramos influência na sobrevida ($p=0,042$), que se deve provavelmente a comparação de ezrin negativo e ezrin positivo-resposta histológica Huvos grau I e II ($p=0,055$). Tabela 26

Tabela 26 – Sobrevida livre de doença pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo interações de Ezrin com resposta histológica à quimioterapia em pacientes não metastáticos.

Grupo	Nº pacientes Não metastáticos	Sobrevida livre de doença % 3 anos	Sobrevida livre de doença % 5 anos	p♦
1. Ezrin negativo	3	100,0	100,0	0,042*
2. Ezrin positivo Huvos III e IV	7	71,4	35,7	0,232**
3. Ezrin positivo Huvos I e II	10	24,0	12,0	0,055*** 0,082****

♦p nível descritivo do teste de associação pelo qui-quadrado

*interação entre 1, 2 e 3

**interação entre 1 e 2

***interação entre 1 e 3

****interação entre 2 e 3

6.3.3 Sobrevida pelo estimador do produto limite de Kaplan Meier segundo variáveis de imunorreatividade da proteína CD44

Em nossa amostra imunorreatividade da proteína CD44 não influenciou significativamente na sobrevida global. Tabela 27

Tabela 27 - Probabilidade de sobrevida global acumulada para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis de imunorreatividade da proteína CD44. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida (%)					p♦*
		Nº casos	Nº óbitos	1 ano	3 anos	5 anos	
CD 44	Negativo	17	10	94,1	47,1	25,3	0,676
	Positivo	17	12	82,4	32,3	21,5	
CD 44	Negativo	17	10	88,2	47,5	25,3	0,515
	Fraca	7	6	71,4	14,3	14,3	
	Moderada	7	5	100	38,1	19,0	
	Intensa	3	1	66,7	xx	xx	
CD 44	Negativo	17	10	94,1	47,1	xx	0,488
	Citoplasma	13	8	76,9	42,2	28,1	
	Difuso	4	4	100	xx	xx	
CD 44	Negativo	17	10	94,1	47,1	xx	0,467
	Até 50%	10	8	70,0	20,0	xx	
	Até 100%	7	4	100	57,1	28,6	

♦p teste de log-rank

xx não completou tempo seguimento

Na nossa casuística a imunorreatividade da proteína ezrin não influenciou significativamente na sobrevida livre de progressão. Tabela 28

Tabela 28 - Probabilidade de sobrevida livre de progressão para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis de imunorreatividade da proteína Ezrin. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida (%)					p♦
		Nº eventos	Nº óbitos	1 ano	3 anos	5 anos	
Ezrin	Negativo	8	1	100,0	85,7	85,7	0,203
	Positivo	26	9	73,1	64,5	xx	

♦p teste de log-rank

xx não completou tempo seguimento

A imunorreatividade da proteína CD44 também não influenciou significativamente na sobrevida livre de progressão. Tabela 29

Tabela 29 - Probabilidade de sobrevida livre de progressão para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis de imunorreatividade da proteína CD44. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida (%)					p♦*
		Nº casos	Nº óbitos	1 ano	3 anos	5 anos	
CD 44	Negativo	17	6	70,6	64,2	xx	0,410
	Positivo	17	4	82,4	75,1	75,1	

♦p teste de log-rank xx não completou tempo seguimento

Na nossa amostra a imunorreatividade do complexo ezrin-CD44 não influenciou significativamente a sobrevida livre de progressão . Tabela 30

Tabela 30 - Probabilidade de sobrevida livre de progressão para os pacientes portadores de osteossarcoma segundo variáveis de imunorreatividade do complexo Ezrin-CD44. Departamento de Pediatria. Hospital de Câncer de Barretos, 2000 a 2005.

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida (%)					p♦
		Nº eventos	Nº óbitos	1 ano	3 anos	5 anos	

Ezrin-CD44	Negativo	5	0	100	100	100	0,274
	Positivo	14	3	85,7	77,9	xx	

♦p teste de log-rank xx não completou tempo seguimento

6.4 CURVAS DE SOBREVIDA ACUMULADA EM 60 MESES PELO ESTIMADOR DO PRODUTO LIMITE DE KAPLAN MÉIER

6.4.1 Sobrevida global

6.4.1.1 Sobrevida global para 34 pacientes

A sobrevida global para a população estudada foi de 84,9% em 1 ano, e 22,6% em 5 anos.

Gráfico 4 - Curvas de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Méier segundo sobrevida global para os pacientes estudados através de imunoistoquímica.

6.4.1.2 Sobrevida global segundo ezrin

De acordo com a imunorreatividade do ezrin os pacientes positivos apresentaram taxa de sobrevida de 12,8% comparado com 41,7% dos pacientes com ezrin negativo ($p = 0,121$) em 5 anos.

Gráfico 5 - Curvas de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Méier segundo imunorreatividade de Ezrin.

6.4.1.3 Sobrevida global segundo CD44

De acordo com a imunorreatividade do CD44 os pacientes positivos apresentaram taxa de sobrevida de 21,5 % comparado com 25,3% dos pacientes com ezrin negativo ($p = 0,676$) em 5 anos.

Gráfico 6 - Curvas de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Méier segundo imunorreatividade de CD44.

6.5.1 Sobrevida livre de progressão

A sobrevida livre de progressão para os 34 pacientes foi de 79,4 % em 1 ano e 69,6 % em 5 anos.

Gráfico 7 - Curva de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Méier segundo sobrevida livre de progressão.

6.5.2 Sobrevida livre de doença para pacientes não metastáticos

A sobrevida livre de doença para os pacientes não metastáticos (21/34) foi de 90,5 % em 1 ano e 36,7 % em 5 anos.

Gráfico 8 - Curva de sobrevida acumulada em 60 meses pelo estimador do produto limite de Kaplan Méier segundo sobrevida livre de doença para os 21 pacientes não metastáticos.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O progresso no desenvolvimento do tratamento do câncer na infância foi espetacular nas últimas quatro décadas. Estima-se que em torno de 70% das crianças acometidas de câncer podem ser curadas, se diagnosticadas precocemente e tratadas em centros especializados. A maioria dessas crianças terá boa qualidade de vida após o tratamento adequado.

Com base em referências dos registros de base populacional, são estimados mais de 9.000 casos novos de câncer infanto-juvenil, no Brasil, por ano. Assim como em países desenvolvidos, no Brasil o câncer já representa a segunda causa de mortalidade entre crianças e adolescentes de 1 a 19 anos, para todas as regiões. Como a primeira causa são aquelas relacionadas aos acidentes e à violência, podemos dizer que o câncer é a primeira causa de mortes por doença, após 1 ano de idade, até o final da adolescência (Ministério da Saúde, 2008).

Algumas características próprias de um país de grande população e dimensões continentais, como recursos de assistência à saúde não uniformes entre outros, oferecem ao portador de osteossarcoma uma realidade que necessita ser avaliada (Penna et al., 1993). Supostamente, a criança tem mais anos a perder, ou a ganhar, uma vez que a sua expectativa de vida é maior do que a do adulto. Se considerarmos a média de anos perdidos devido ao câncer, são as crianças que apresentam os maiores índices nas estatísticas americanas (Bleyer, 1993).

O progresso obtido nas últimas quatro décadas é atribuído, principalmente, à inserção em grandes grupos cooperativos, levando à inversão da evolução de 80% de mortalidade para 80% de sobrevida, nesse período. O reconhecimento de variáveis prognósticas permitiu refinamentos no diagnóstico e estadiamento dos tumores da

criança e do adolescente (Lukens, 1994). Apesar dos avanços na terapia e aumento na sobrevida, um número substancial de pacientes irá desenvolver metástases e/ou apresentará má resposta à quimioterapia e consequentemente prognóstico ruim (Mascarenhas et al., 2009). Isso tem estimulado a identificação precoce de fatores que possam guiar a terapia, porém a literatura publicada por diversos grupos mostra resultados parcialmente inconsistentes. No osteossarcoma, os fatores anatomopatológicos tradicionais e clínicos são em geral insuficientes para predizer a evolução e resposta tumoral; sendo assim, vários estudos vêm sendo realizados utilizando técnicas imunoistoquímicas e moleculares, em busca de novos marcadores prognósticos com o objetivo de melhorar os resultados terapêuticos.

Em nossa Instituição o tumor ósseo é uma das neoplasias sólidas mais frequentes, com incidência semelhante aos tumores do sistema nervoso central, representando cada um aproximadamente 15% dos casos novos/ano. Devido a algumas particularidades, como atendimentos de pacientes em âmbito nacional, tivemos 46,2 % de pacientes metastáticos ao diagnóstico, 37,3 % de tumores maiores que 15 cm, 30,2 % de amputações e 11,5 % de recaídas locais em cirurgias conservadoras.

Em nosso meio, muitos pacientes ainda são encaminhados ao centro de tratamento com doenças em estágio avançado, o que se deve a vários fatores: desinformação dos pais, medo do diagnóstico de câncer, desinformação dos médicos. O atraso diagnóstico continua sendo um fator importante. Avaliando variáveis sócio-demográficas, clínicas e econômicas e relacionando-as com a história da doença, verifica-se que o atraso é multifatorial.

Bielack et al. (2002) reportaram média de 69 dias (variando de 1 dia a 5 anos e 8 meses) de início dos sintomas ao diagnóstico do osteossarcoma. Castro et al. (2008) mostraram em série nacional que o intervalo de tempo médio entre os

primeiros sinais e sintomas e a realização de diagnóstico definitivo foi de 104 dias. Na nossa amostra, o tempo de queixa mostrou-se menor que 3 meses em 65% dos casos, com proporções semelhantes entre tumores maiores e menores que 15 cm e de doença metastática ou não, o que reflete provavelmente uma doença agressiva, e não atraso diagnóstico.

Cem por cento dos pacientes que tinham mais de 3 meses de queixa estavam acima dos 10 anos. Podemos especular que a mãe leva a criança menor ao médico mais rápido e que o adolescente tem mais resistência a procurar o médico, concordante com Rodrigues e de Camargo (2003) que referem que os adolescentes apresentam o maior intervalo de tempo, sugerindo um diagnóstico tardio, provavelmente com doença mais avançada. Não conseguimos definir a causa de demora entre o início dos sintomas e o diagnóstico, uma vez que não estabelecemos relação com proximidade a um centro especializado ou local de procedência do paciente (Estado de SP e outros). Podemos ressaltar que trata-se de população com nível socioeconômico-cultural baixo e com uma doença rara, que muitos profissionais de saúde não estão familiarizados e, portanto, não consideram a possibilidade diagnóstica.

Não há consenso sobre qual é a melhor forma ou método para mensurar o tamanho do tumor primário e qual é o tamanho do tumor que pode ser considerado grande. Há na literatura descrições de medida do maior eixo do exame radiológico inicial, e na peça cirúrgica, relação do tumor com o tamanho do osso e descrição de medida de volume tumoral. Na nossa avaliação usamos a medida do maior eixo na radiografia simples ao diagnóstico e evidenciamos tamanho tumoral variando de 4,5 cm a 26,0 cm, com média de 12,5 cm e mediana de 13,1 cm. Apenas 10 pacientes tinham lesão de até 8 cm (T1 – TNM), 19 (36,5%) pacientes tinham lesão maior ou igual a 15 cm, sendo que destes 3 pacientes eram menores que 10 anos. O GBTO II

evidenciou que 20% dos tumores eram maiores que 15 cm, sendo considerado fator prognóstico relevante (apesar de que 40% dos tumores não foram medidos). A Clínica Mayo mostrou 12% de tumores maiores que 15 cm no período de 1974 a 1981 (Taylor et al., 1985). Quando consideramos tumores grandes aqueles com 12 cm no maior eixo, temos 41% da amostra. Petrilli et al. (2006) evidenciaram 42,9%.

O tamanho tumoral é considerado fator prognóstico (Goorin et al., 1987; Raymond et al., 1987; Spanier et al., 1990; Link et al., 1991; Davis et al., 1994). Tumores volumosos representam fator negativo de responsividade à quimioterapia e recidiva, atribuídos ao aparecimento de clones resistentes (Smeland et al., 2003). Não demonstramos em nossa análise que tumores grandes apresentam associação com grau de Huvos ou recaída, mas esse é um fator que pode e deve ser modificado através de divulgação e conscientização da população sobre a existência da patologia e o risco aumentado de morte em tumores grandes.

O prognóstico é determinado pelo controle local do tumor primário e pelo desenvolvimento de metástases. A presença de metástases está associada com maior duração de sintomas e tamanho do tumor, que é indicador de doença avançada (Bielack et al., 2002). No grupo italiano essa associação não foi confirmada e Bacci et al. (2002a) levantam a hipótese que fatores biológicos possam interferir. A publicação do GBTO III e IV revelou maior porcentagem de pacientes metastáticos (20,9%) que outros grupos norte-americanos e europeus. Mesmo assim não foi possível constatar que a presença de metástases estava relacionada ao atraso diagnóstico, nem associar a duração dos sintomas com o tamanho do tumor. Essas informações também sugerem que o estágio da doença esteja relacionado com aspectos biológicos (Petrilli et al., 2006). Na nossa amostra também não demonstramos associação da duração dos sintomas com o tamanho do tumor, com grau de necrose, recaída ou sobrevida.

Como dito anteriormente, a publicação do GBTO III e IV (Petrilli et al., 2006) mostra 20,9% de pacientes metastáticos ao diagnóstico, que é mais elevado que a frequência reportada por autores internacionais como Bacci et al (2000) que é de 16%, Bielack et al. (2002) que encontraram 11,4% e de Meyers et al. (2005) que é de 10%. Na nossa amostra, evidenciamos 46,2% de pacientes metastáticos, que é ainda mais elevada que a taxa reportada por Rech et al. (2004) em Porto Alegre, (38%), e Castro et al. (2008) na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (25%).

Dentre os fatores anatomopatológicos mais importantes na avaliação prognóstica do osteossarcoma, está a resposta histológica ou grau de necrose induzido pela quimioterapia, que é considerado como fator preditivo de sobrevida livre de doença (Raymond et al., 1987; Spanier et al., 1990; Glasser et al., 1992; Davis et al., 1994; Bacci et al., 1998). Alguns autores referem que o grau de necrose na maioria das séries esta relacionado à menor probabilidade de ter metástases, recorrência local (Bacci et al., 2001b), porém sabemos que a presença de metástases não é incomum entre bons respondedores e essa avaliação histológica não representa necessariamente a biologia do tumor. Na nossa amostra entre os bons respondedores tivemos 35% de pacientes com metástases e 35% com tumores maiores que 15 cm. O índice de necrose na nossa amostra evidenciou 26,9% de bons respondedores (> 90%), também coincidentes com a publicação do GBTO III e IV que é de 29,4%. Dez pacientes não tinham a avaliação de resposta histológica pós-quimioterapia, sendo eles os que não foram submetidos à cirurgia ou portadores de osteossarcoma parosteal.

Quando relacionamos o índice de necrose à sobrevida global em nossa amostra, não mostramos significância estatística (p: 0,073). Os protocolos SFOP OS 87 e OS 94 também não demonstraram o grau de necrose como fator prognóstico, sendo uma possível explicação relatada na publicação que a maioria dos pacientes

incluídos tinha metástases ósseas, o que é um fator prognóstico mais forte. Ilic et al. (2004) não mostraram associação significativa entre o grau de necrose e prognóstico em 36 pacientes analisados, assim como Castro et al. (2008) em uma série nacional de 60 casos (p: 0,158). Em nosso estudo, o que pode ter contribuído é que em 20% dos pacientes o grau de Huvos não foi avaliado, e utilizamos o grau de necrose relatado no laudo anatomopatológico, analisado por diversos patologistas em diferentes épocas e que não foi possível revisar.

O seguimento médio dos pacientes foi de 28,2 meses. Dezesete pacientes encontram-se fora de terapia, sendo 13 pacientes não metastáticos e 4 metastáticos ao diagnóstico.

Sessenta e um por cento dos pacientes (32/52) evoluíram a óbito, sendo 31 devido ao acometimento pulmonar do osteossarcoma, evoluindo para insuficiência respiratória e um por mielodisplasia.

Quando os fatores prognósticos são estudados, o que se procura é entender sua inter-relação, não só por seus efeitos individuais, mas, também, como interagem entre si na apresentação inicial, se estão ou não relacionados com as taxas de sobrevida final, bem como se os resultados estão relacionados às varias combinações de fatores prognósticos múltiplos. Tal interesse está focalizado na identificação dos fatores que têm o maior impacto sobre o prognóstico.

O processo de metástases envolve uma cascata de ligação, passos sequenciais envolvendo múltiplas interações tumor-hospedeiro. Esse processo é regulado por ativação e/ou regulação de muitos genes. O gene *Ezrin* pode estar envolvido na iniciação e/ou transformação das células do osteossarcoma. Frente a isso, a identificação da expressão do Ezrin na biópsia é uma vantagem, uma vez que o grau de necrose, que é a variável prognóstica mais importante, só pode ser identificado após a administração de quimioterapia, ou seja, 3 a 4 meses após o diagnóstico.

Ezrin tem se mostrado promissor em várias neoplasias e pode ser um guia para identificar pacientes de alto risco e individualizar o tratamento. Infelizmente, as tecnologias de imagens avaliáveis rotineiramente não detectam lesões muito pequenas ou células tumorais metastáticas isoladas.

Park et al. (2006) avaliaram Ezrin através de imunoistoquímica e amplificação do mRNA através da técnica de Western blotting e RT-PCR e confirmaram que a expressão aberrante de Ezrin é confirmada pela correspondente alteração do nível de mRNA. Ogino et al. (2007) reproduziram esses dados.

Na nossa amostra, a imunorreatividade do Ezrin foi detectada na maioria dos pacientes com osteossarcoma (76,5%). Na literatura essa porcentagem é muito variável, sendo que Khanna et al. (2004) mostraram 95% de positividade e Park et al. (2006) mostraram 43%. Dos pacientes com Ezrin positivo 35% tinha metástases, 41% tinha má resposta histológica à quimioterapia, 50% recaiu e 65% progrediu.

Ferrari et al. (2008) demonstraram em 95 pacientes com osteossarcoma não metastáticos, 80% era Ezrin positivo, 49% localizado no citoplasma e 51% localizado difusamente. A sobrevida livre de evento foi respectivamente de 80% para ezrin citoplasmático e 52% para Ezrin difuso (p: 0,020). Na nossa casuística não demonstramos associação da agressividade com localização da imunorreatividade de Ezrin.

A única paciente com osteossarcoma de baixo grau (parosteal) apresentou Ezrin negativo, concordante com Park et al. (2005) que reportaram que cem por cento dos tumores de baixo grau apresentava Ezrin negativo. Como os tumores de baixo grau são raros nesta faixa etária, não foi possível fazer comparação. Os 2 pacientes com tumor multicêntrico tinham Ezrin com escore máximo, assim como os 3 portadores de osteossarcoma axial.

Khanna et al. (2004) mostraram diferença na sobrevida livre de metástase entre grupos de alta e baixa expressão. Kim et al. (2008) evidenciaram que dos 33 pacientes com Ezrin positivo, 23 apresentavam alta expressão, porém aplicando análise similar não observaram diferença na sobrevida. Em nosso estudo também não mostramos diferença de sobrevida entre os grupos de alta (39,6%) e baixa (16,7%) expressão de Ezrin ($p: 0,190$).

Na nossa casuística, todos os pacientes com recorrência local tinham Ezrin positivo (dados não mostrados), concordante com a publicação de Kim et al. (2008). Esses resultados sugerem que a recaída local não depende exclusivamente da margem cirúrgica. Uma possível explicação para isso é que nesses pacientes temos padrão de crescimento infiltrativo, conforme demonstrou Weng et al. (2005).

Não demonstramos associação da positividade de Ezrin com a sobrevida do osteossarcoma ($p: 0,121$), sendo que entre os pacientes Ezrin positivos a taxa de sobrevida em 5 anos foi de 12,8% comparada com 41,7% dos pacientes com Ezrin negativo; mas quando aplicamos a categorização de risco descrita por Kim et al. (2007), usando a interação de Ezrin com resposta histológica à quimioterapia para pacientes não metastáticos, demonstramos influência na sobrevida livre de metástases ($p=0,042$), que provavelmente se deve à comparação de Ezrin negativo com Ezrin positivo e má resposta histológica ($p:0,055$).

A outra proteína escolhida para ser estudada foi o CD44, por ter sido a primeira proteína de superfície em que foi demonstrada interação com as proteínas do complexo ERM. A superexpressão de CD44 e algumas isoformas variantes são vistas como marcadores de comportamento agressivo, conferindo potencial metastático (Weber et al., 2002). Kim et al. (2002) referem que o CD44v5 confere comportamento metastático ao osteossarcoma, já Kuryu et al. (1999) referem que o CD44v6 é relacionado a pior prognóstico em pacientes com osteossarcoma.

Utilizamos o CD44H (Hcam) e 50% dos pacientes mostraram-se positivos, sendo que 29% tinha metástases, 53% recaiu e 23% apresentou progressão. A taxa de sobrevida global foi semelhante para pacientes com esse marcador positivo (21,5%) ou negativo (25,3%), sem diferença estatística ($p: 0,676$).

Ezrin interage com a cauda do citoplasma do produto do gene *CD44*. O aumento na expressão de CD44 potencialmente leva a um aumento funcional da ativação do Ezrin. Apenas 14/34 pacientes apresentavam complexo Ezrin-CD44 positivos simultaneamente, sem associação com nenhuma variável estudada e sem relação com prognóstico.

A sobrevida global (SG) da população estudada foi de 22,6% em 5 anos. Em 50 pacientes tratados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre no período de 1992 a 2001, a SG em 5 anos foi de 29,7% (Rech et al., 2004); numa série de 60 casos tratados na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo no período de 1991 a 2002, a SG em 48 meses foi de 38,4% (Castro et al., 2008), e numa série de 97 pacientes com idades variando entre 6 e 70 anos tratados no Hospital A.C. Camargo no período de 1985 a 2000, a SG em 5 anos foi de 55,2% (dados não publicados). No grupo Brasileiro a sobrevida global foi de 50,1% e SLE de 39%. O *EUROCORE* demonstrou sobrevida de 52% (Stiller et al., 2001). A sobrevida global em 5 anos no nosso estudo para pacientes com e sem metástases foi respectivamente de 17% e 39%. O grupo *COSS* alcançou 40,3% de sobrevida em 10 anos para os metastáticos que tiveram ressecção cirúrgica completa dos nódulos pulmonares.

Apesar dos grandes avanços no tratamento do osteossarcoma nos últimos anos, a busca por melhores resultados ainda se faz necessária. Estratificar os pacientes em grupos de risco para recidiva e óbito tratando agressivamente os de alto risco e poupando os de baixo risco, é um dos objetivos atuais da oncologia pediátrica.

Há várias limitações no nosso estudo, como o fato de ser retrospectivo e ter pequeno número de amostras analisadas. O número de amostras reduzido limita o poder estatístico. O grau de Huvos e as tomografias de tórax foram realizados por diferentes médicos, com diferentes protocolos e não foram revisados. A correlação entre os subtipos histológicos, número de metástases e lateralidade pulmonar, a avaliação da realização correta da biópsia, a presença de fratura patológica ou não, o tipo de cirurgia realizada, não foram avaliados devido ao pequeno número de casos, assim como o tempo entre a chegada no hospital e o início do tratamento.

A literatura apresenta níveis de expressão variáveis para o Ezrin. Portanto podemos arguir que é um marcador diagnóstico com baixa sensibilidade. Somado a isso, não foi feita a “normalização” para o tecido ósseo normal com finalidade de análise de intensidade de coloração, que é subjetiva. Devemos lembrar ainda que a descalcificação realizada pode alterar a antigenicidade.

O método detectou o Ezrin total, e não o fosforilado. Seria interessante comparar a expressão de Ezrin na biópsia, na peça cirúrgica do tumor primário, da recidiva local e na metástase do mesmo paciente, assim como a checagem no material fresco por outros métodos e com maior número de casos.

Outras isoformas variantes do CD44 poderiam ter sido estudadas, como fizeram Kuryu et al. (1999), uma vez que não se sabe qual delas melhor se associa com prognóstico.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

1. A imunorreatividade do Ezrin foi detectada na maioria dos pacientes com osteossarcoma (76%), com igual distribuição em citoplasma e membrana (38,2%). Quanto à intensidade de coloração, tivemos 58,9% forte. Na escala semiquantitativa metade dos casos apresentou mais de 50% das células coradas. No escore que associa intensidade de coloração e proporção de células coradas tivemos 50,0% com alta expressão. Cinquenta por cento dos pacientes mostraram CD44H positivo, sendo predominante no citoplasma (38,2%). Na escala semiquantitativa 20,6 % apresentava coloração em mais de 50% das células.
2. Ambos os marcadores não mostraram associação a nenhuma variável clínico-patológicas estudada.
3. Entre os pacientes ezrin positivos a taxa de sobrevida apresentada em 5 anos foi de 12,8% comparado com 41,7% dos pacientes com ezrin negativo, mas sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,121$). O escore de ezrin também não mostrou papel na sobrevida ($p: 0,558$). Já a interação da positividade de Ezrin com má resposta histológica para pacientes não metastáticos mostrou associação com sobrevida livre de recaída ($p: 0,042$). Quanto à taxa de sobrevida global foi semelhante para pacientes com CD44 positivo (21,5%) ou negativo (25,3%) sem diferença estatística ($p: 0,676$).
4. Em nossa experiência, nem CD44H nem Ezrin mostraram ser preditor do prognóstico em pacientes com osteossarcoma. Os resultados sugerem que são necessárias outras investigações para melhor definir a relação entre padrão de expressão de Ezrin e CD44, status funcional e sobrevida em portadores de osteossarcoma.

ANEXOS

7 ANEXOS

ANEXO I - FICHA CLINICA - OSTEOSARCOMA

1- Caso: _____

2- RG: _____

3- Nome: _____

4- Data de Nascimento: ____/____/____

5- Data de Admissão: ____/____/____

6- Sexo: Masculino (0) Feminino (1) []

7- Raça: Branco (0) Não-branco (1) []

8- Procedência (Estado) _____

9. Tratamento Prévio:
Não (0); sim (1) []

10. Tempo de Queixa: _____ meses

11. Início do Tratamento ____/____/____

12. LOCALIZAÇÃO
Fêmur (0) Outro (1) []

13. TAMANHO DO TUMOR
Menor 15 CM (0) Maior 15 CM (1) []

14. DHL ao diagnóstico
nl (0) Maior 1.000(1) []

15. ESTADIO:
Metastático (0) Metastático (1) []

16. METÁSTASE
Pulmão (0) Ossos (1) Simultânea (2) []

17. PROTOCOLO
GBTO (0) CCG(1) []

18. CIRURGIA ____/____/____
Conservadora (0) Amputação(1) []

19. HISTOLOGIA

Clássico (0) outros (1) []

20. GRAU DE NECROSE

I(0) II (1) III (2) IV(3) []

21. RECAÍDA

Local (0) Distância (1) []

22. DATA DA RECAÍDA

_____ / _____ / _____
precoce /menos 1 ano(0) tardia/ mais 1 ano(1) []

23. PROGRESSÃO

_____ / _____ / _____
Não (0); sim (1) []

24. Estado Atual

Vivo sem doença (1); []

Vivo com doença (2);

Óbito por doença ou complicação(3);

Óbito por outra causa (4);

Perdido de seguimento (5)

25. ÓBITO

_____ / _____ / _____
Doença(0) Toxicidade (1) Outras (2) []

26. DATA DA ÚLTIMA CONSULTA:

_____ / _____ / _____

ANEXO II - PROTOCOLOS

GRUPO BRASILEIRO PARA TRATAMENTO DE TUMORES ÓSSEOS NA INFÂNCIA - GBTTO1999

semana -6 - CICLOFOSFAMIDA 2g/m²2d

semana -3 - CICLOFOSFAMIDA 2g/m²2d

semana 0 - CISPLATINA 60 mg/m² 2d, DOXORRUBICINA 45mg/m² 2d

semana 3 - IFOSFAMIDA 2,8 g/m² 5d

semana 6 - CISPLATINA 60 mg/m² 2d, DOXORRUBICINA 45mg/m² 2d

semana 9 - IFOSFAMIDA 2,8 g/m² 5d

semana12 - Cirurgia

semana 15 -CISPLATINA 60 mg/m² 2d, DOXORRUBICINA 45mg/m² 2d

semana 17 - Ttoracotomia

semana 18 - IFOSFAMIDA 2,8 g/m² 5d

semana 21 - CISPLATINA 60 mg/m² 2d, DOXORRUBICINA 45mg/m² 2d

semana 24 - IFOSFAMIDA 2,8 g/m² 5d

CHILDREN CANCER GROUP - CCG 9754

Pilot 1 – Doxo intensification without Ifosfamide

Pre-operative therapy

Week 1, 6 – aP

Week 4, 5, 9, 10 – M

Week 11 – surgery

Post operative therapy

Good Response

Week 14,17 – aP

Week 13, 16, 19, 22, 25, 28 – M

Week 20, 23 – a

Standard response

Week 14,17 – aP

Week 13, 16, 19, 22, 25, 28 – M

Week 20, 23, 26, 29 – a

Pilot 2 – Doxo intensification with Ifosfamide

Pre-operative therapy

Week 1 – ai

Week 6 – aP

Week 4,5,9,10 – M

Week 11 – surgery

Post operative therapy

Good Response

Week 14,20 – ai

Week 17,23 – aP

Week 13,16,19,22,25,28 – M

Week 26 – P

Standard response

Week 14,20, 26 – ai

Week 17, 23, 29 – aP

Week 13,16,19,22,25,28 – M

Week 31 - i

Pilot 3 – Ifosfamide/Etoposide intensification

Pre-operative therapy

Week 1 – ai

Week 6 – aP

Week 4,5,9,10 – M

Week 11 – surgery

Post operative therapy

Good Response

Week 14,20 – ai

Week 17,23 – aP

Week 13,16,19,22,25,28 – M

Week 26 – P

Standard response

Week 14, 23, 26 – Ie

Week 17 – ai

Week 20, 30, 33 – aP

Week 13,19,29,32,35,36 – M

drugs

a=doxo 37,5mg/m², 2d with dexrazoxane 375mg/m²

P=cisplatina 60mg/m², 2d

i=ifosfamide 1,8g/m²,5d

I=Ifosfamide 2,8g/m²,5d

e=etoposide 100mg/m²,5d

ANEXO III - EZRIN

Foi realizado o seguinte protocolo técnico:

Desparafinização das lâminas deixadas por 24 horas em estufa 60°C:

Xilol a 60°C por 20 minutos

Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos

Etanol 100% 30 segundos

Etanol 85% 30 segundos

Etanol 70% 30 segundos

Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna®, Nigro) destampada, mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta.

Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Contar 4 minutos após esse sinal.

Deixar a panela fechada sob água corrente por 10 minutos. Destampar a panela com as lâminas e deixar por mais 10 minutos à temperatura ambiente.

Lavar as lâminas em água corrente e destilada

Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada

Lavar em água corrente e destilada

Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme tabela abaixo em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Ezrin (p81) Ab-1	3C12	1:1000	LabVision cat # MS-661, Fremont, California, EUA

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubar por 30 min a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido).

Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.

Incubar com o NovoLink Polymer por 30 min a 37° C

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubar as lâminas em solução substrato: 60 mg% de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.

Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.

Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

Lavar bem em água corrente e destilada

Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

Desidratar as lâminas em:

Etanol 80%, 30 segundos

Etanol 95%, 30 segundos

Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada

Xilol 4 vezes, 30 segundos cada

Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha)

CD44 (HCam)

Desparafinização das lâminas deixadas por 24 horas em estufa 60°C:

Xilol a 60°C por 20 minutos

Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos

Etanol 100% 30 segundos

Etanol 85% 30 segundos

Etanol 70% 30 segundos

Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada

Lavar em água corrente e destilada

Lavar com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme tabela abaixo em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
CD44 (Hcam)	F10-44-2	1:50	Novocastra cód # NCL-CD44, New Castle, Reino Unido

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubar por 30 min a 37° C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido).

Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.

Incubar com o NovoLink Polymer por 30 min a 37° C

Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Incubar as lâminas em solução substrato: 60 mg% de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H_2O_2 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.

Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.

Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.

Lavar bem em água corrente e destilada

Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

Desidratar as lâminas em:

Etanol 80%, 30 segundos

Etanol 95%, 30 segundos

Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada

Xilol 4 vezes, 30 segundos cada

Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha)

ANEXO IV – Carta de aprovação do CEP

HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS

Reg. no C. N. S. S. 242.299/78
Utilidade Pública Federal Lei Nº 90.935/85
Utilidade Pública Estadual Lei Nº 2.224/79
Utilidade Pública Municipal Lei Nº 3.166/78
Inscrição no C.N.P.J. 49.150.352/0001-12
Inscrição Estadual 204.032.103.118

Barretos, 23 de outubro de 2006.

Prezado (a) Sr.(a). Investigador (a)

Erica Boldrini

Protocolo 052/2006: "Avaliação imunohistoquímica de Metaloproteinase 9 e Ezrin no Osteossarcoma".

Foram analisadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII, em reunião ordinária realizada no dia 19/10/06, as pendências respondidas pelo investigador, com a seguinte decisão do Comitê: está enquadrado na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução CNS 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, 10/10/96.

Atenciosamente,

Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do CEP
Fundação Pio XII

REFERÊNCIAS

10 REFERÊNCIAS

Akisawa N, Nishimori I, Iwamura T, Onishi S, Hollingsworth MA. High levels of Ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258:395-400.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia molecular da célula*. 3ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular; p.949-1009.

Anderson P, Nunez R. Samarium lexidronam (153Sm-EDTMP): skeletal radiation for osteoblastic bone metastases and osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007;7:1517-27.

Anderson P, Wiseman GA, Dispenzieri A, Arndt CA, Hartmann LC, Smithson WA, Mullan BP, Bruland OS. High-dose samarium-153 ethylene diamine tetremethylene phosphonate: low toxicity of skeletal irradiation in patients with osteosarcoma and bone metastases. *J Clin Oncol.* 2002;20:189-96.

Arndt CA, Crist WM. Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N Engl J Med.* 1999;341:342-52.

Assimakopoulos D, Koletta E, Patrikakios G, Evangelou A. The role of CD44 in the development and prognosis of head and neck squamous cell carcinomas. *Histol Histopathol.* 2002;17:1269-81.

Ayala AG, Raymond AK, Jaffe N. The pathologist's role in the diagnosis and treatment of osteosarcoma in children. *Hum Pathol.* 1984;15:258-66.

Bacci G, Briccoli A, Rocca M, Ferrari S, Donati D, Longhi A, Bertoni F, Bacchini P, Giacomini S, Forni C, Manfrini M, Galletti S. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, and doxorubicin and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol.* 2003;14:1126-34.

Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, Longhi A, Casadei R, Fabbri N, Forni C, Versari M, Campanacci M. Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the Istituto Ortopedico Rizzoli according to the istituto ortopedico rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report. *J Clin Oncol.* 2000;18:4016-27.

Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Picci P, Bacchini P, Longhi A, Donati D, Forni C, Campanacci L, Campanacci M. Histologic response of high grade nonmetastatic osteosarcoma of the extremity to chemotherapy. *Clin Orthop* 2001a; 386:186-96.

Bacci G, Ferrari S, Delepine N, Bertoni F, Picci P, Mercuri M, Bacchini P, Brach del Prever A, Tienghi A, Comandone A, Campanacci M. Predictive factors of histologic response to primary chemotherapy in osteosarcoma of the extremity: study of 272 patients preoperatively treated with high dose methotrexate, doxorubicin, and cisplatin. *J Clin Oncol.* 1998;16:658-63.

Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Forni C, Ruggieri P, Briccoli A, De Paolis M, Setola E. Preoperative therapy versus immediate surgery in nonmetastatic osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 2003;21:4662-3.

Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Picci P, Mercuri M, Alvegard TA, Saeter G, Donati D, Manfrini M, Lari S, Briccoli A, Forni C; Italian Sarcoma Group/Scandinavian Sarcoma Group. High dose ifosfamide in combination with high dose methotrexate, adriamycin and cisplatin in the neoadjuvant treatment of extremity osteosarcoma. *J. Chemother.* 2002a;14:198-206.

Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Forni C, Zavatta M, Versari M, Smith K. High grade osteosarcoma of the extremity: Differences between localized and metastatic tumors at presentation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002c;24:27-30.

Bacci G, Ferrari S, Tienghi A, Bertoni F, Mercuri M, Longhi A, Fiorentini G, Forni C, Bacchini P, Rimondini S, De Giorgi U, Picci P. A comparison of methods of loco-regional chemotherapy combined with systemic chemotherapy as neoadjuvant treatment of osteosarcoma of the extremity. *Eur J Surg Oncol* 2001b; 27:98-104.

Bacci G, Forni C, Ferrari S, Longhi A, Bertoni F, Mercuri M, Donati D, Capanna R, Bernini G, Briccoli A, Setola E, Versari M. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremity: intensification of preoperative treatment does not increase the rate of good histologic response to the primary tumor or improve the final outcome. *J Pediatr Hematol/Oncol*. 2002b;25:845-52.

Bacci G, Ferrari S, Tienghi A, Bertoni F, Mercuri M, Longhi A, Fiorentini G, Forni C, Bacchini P, Rimondini S, De Giorgi U, Picci P. A comparison of methods of loco-regional chemotherapy combined with systemic chemotherapy as neoadjuvant treatment of osteosarcoma of the extremity. *Eur J Surg Oncol* 2001b; 27:98-104.

Bacci G, Longhi A, Bertoni F, Bacchini P, Ruggeri P, Versari M, Picci P. Primary high-grade osteosarcoma: comparison between preadolescent and older patients. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2005;27:129-34.

Bacci G, Longhi A, Ferrari S, Briccoli A, Donati D, De Paolis M, Versari M. Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase in osteosarcoma of the extremity: experience at Rizzoli on 1.421 patients treated over the last 30 years. *Tumori*. 2004;90:478-84.

Bacci G, Mercuri M, Briccoli A, Ferrari S, Bertoni F, Donati D, Monti C, Zanoni A, Forni C, Manfrini M. Osteogenic sarcoma of the extremity with detectable lung metastases at presentation. Results of treatment of 23 patients with chemotherapy followed by simultaneous resection of primary and metastatic lesions. *Cancer*. 1997;79:245-4.

Bacci G, Picci P, Briccoli A, Avalla M, Ferrari S, Femino FP, Monti C, Ruggieri P, Rizzente AG, Casadei R. Osteosarcoma of the extremity metastatic at presentation: results achieved in 26 patients treated with combined therapy (primary chemotherapy followed by simultaneous resection of the primary and metastatic lesions). *Tumori*. 1992;78:200-6.

Bacci G, Picci P, Ruggieri P, Mercuri M, Avella M, Capanna R, Brach Del Prever A, Mancini A, Gherlinzoni F, Padovani G. Primary chemotherapy and delayed surgery (neoadjuvant chemotherapy) for osteosarcoma extremities: the Istituto Rizzoli experience in 127 patients treated preoperatively with intravenous methotrexate (high versus moderate doses) and intra-arterial cisplatin. *Cancer*. 1990;65:2539-53.

Bacci G, Pignatti G, Dallari D, Mercuri M, Bertoni F, Bacchini P, Fontana M, Avella M, Campanacci M. Primary chemotherapy and delayed surgery (neoadjuvant chemotherapy) for teleangiectatic osteogenic sarcoma of extremities. *J Chemother*. 1989;1:190-6.

Bal N, Yildirim S, Nursal TZ, Bolat F, Kayaselçuk F. Association of ezrin expression in intestinal and diffuse gastric carcinoma with clinicopathological parameters and tumor type. *World J Gastroenterol*. 2007;13:3726-9.

Ballance WA Jr, Mendelsohn G, Carter JR, Abdul-Karim FW, Jacobs G, Makley JT. Osteogenic sarcoma: malignant fibrous histiocytoma subtype. *Cancer*. 1988;62:763-71.

Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Brodano G, Manara MC, Maurici D, Bacci G, Bertoni F, Picci P, Sottili S, Campanacci M. Expression of P-glycoprotein in high grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *N Engl J Med*. 1995;333:1380-5.

Bane BL, Evans HL, Ro JY, Carrasco CH, Grignon DJ, Benjamin RS, Ayala AG. Extraskelatal osteosarcoma: a clinicopathologic review of 26 cases. *Cancer*. 1990;65:2762-70.

Bastos TMM, Sefarini OA, Barrios CHE, Velasco PA. Osteossarcoma: tratamento e fatores prognósticos. *Rev Bras Ortop.* 1999;34:59-62.

Batanian JR, Cavalli LR, Aldosari NM, Ma E, Sotelo-Avila C, Ramos MB, Rone JD, Thorpe CM, Haddad BR.. Evaluation of pediatric osteosarcoma by classic cytogenetic and CGH analyses. *Mol Pathol.* 2002;55:389-93.

Berman SD, Calo E, Landman AS, Danielian PS, Miller ES, West JC, Fonhoue BD, Caron A, Bronson R, Bouxsein ML, Mukherjee S, Lees JA. Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of RB and p53 in the osteoblast lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:11851-6.

Bertoni F, Dallera P, Bacchini P, Marchetti C, Campobassi A. The Istituto Rizzoli-Beretta experience with osteosarcoma of the jaw. *Cancer.* 1991;68:1555-2563.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. Bone marrow stromal cells: nature, biology and potencil applications. *Stem Cells.* 2001;19:180-92.

Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Werner M, Winkelmann W, Zoubek A, Jürgens H, Winkler K. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1.702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study froup protocols. *J Clin Oncol.* 2002;20:776-90.

Bieling P, Rehan N, Winkler P, Helmke K, Maas R, Fuchs N, Bielack S, Heise U, Jurgens H, Treuner J, Romanowski R, Exner U, Kotz R, Winkler K. Tumor size and prognosis in aggressively treated osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 1996;14:848-58.

Blasier D, Mayba I, Ferguson C, Desa D, Bishop A, Letts M. metastatic osteosarcoma and multiple resection. *J Bone Joint Surg Br.* 1986;68:748-50.

Bleyer AW. Supportive care is more than supportive [foreword]. In: Ablin AR, editor. *Supportive care of children with cancer: current therapy and guidelines from the children's cancer group*. 2nd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1997.p.xii-iii.

Bleyer WA. What can be learned about childhood cancer from Cancer Statistics Review 1973-1988. *Cancer*. 1993;71:3229-36.

Boehm AK, Neff JR, Squire JA, Bayani J, Nelson M, Bridge JA. Cytogenetic findings in 36 osteosarcoma specimens and a review of the literature. *Pediat Pathol Mol Med*. 2000;19:359-76.

Bohling T, Turunen O, Jaaskelainen J, Carpen O, Sainio M, Wahlstrom T, Vaheri A, Haltia M. Ezrin expression in stromal cells of capillary hemangioblastoma. *Am J Pathol*. 1996; 148:367-73.

Bramwell VH. Osteosarcoma and others cancers of bone. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:330-6.

Brennan MF, Alektiar KM, Maki RG. Sarcoma of the soft tissue and bone. In: DeVita Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer principles & practice of oncology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p.1841-935.

Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: Integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3:586-99.

Briccoli A, Rocca M, Salone M, Bacci G, Ferrari S, Balladelli A, Mercuri M. Resection of recurrent pulmonary metastases in patients with osteosarcoma. *Cancer*. 2005;104:1721-5.

Brockstein BE. Metastatic osteosarcoma: a curable advanced malignancy. *J Clin Oncol*. 2004;22:5017-8.

Broström LA. On the natural history of osteosarcoma: aspects of diagnosis, prognosis and endocrinology. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1980;(183):1-38.

Broström LA, Ingimarsson S, Stander H, Eklund G. Correlation between prognostic factors and blood variables in osteosarcoma. *Acta Med Scand.* 1980;207:429-31.

Broström LA, Strander H, Nilsson U. Survival in osteosarcoma in relation to tumor size and location. *Clin Orthop Relat Res.* 1982;(167):250-4.

Brown MJ, Nijhara R, Hallam JA, Gignac M, Yamada KM, Erlandsen SL, Delon J, Kruhlak M, Shaw S. Chemokine stimulation of human peripheral blood T lymphocytes induces rapid dephosphorylation of ERM proteins, which facilitates loss of microvilli and polarization. *Blood.* 2003;102: 3890-9.

Bruce B, Khanna G, Ren L, Landberg G, Jirstrom K, Powell C, Borczuk A, Keller ET, Wojno KJ, Meltzer P, Baird K, McClatchey A, Bretscher A, Hewitt SM, Khanna C. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24:69-78.

Cassone AE, Barbi-Gonçalves JC, Silva AAM, Epelman S, Amstalden EMI. Tratamento multidisciplinar do osteossarcoma. *Rev Bras Ortop.* 1998;38:835-40.

Cassone AE, Picci P, Campanacci M. Recidiva local em osteossarcoma. *Rev Bras Ortop.* 1997;32:882-6.

Castro HC, Ribeiro KCB, Bruniera P. Osteossarcoma: experiência de Oncologia Pediátrica da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. *Rev Bras Ortop.* 2008;43:108-15.

Chai LX, Sun KL, Guo LP, Zhang HT, Lu SX. Expression of ezrin and CD44-v6 in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2007; 29:685-8.

Chang C, Werb Z. The many of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001;11:37-43.

Chen W, He M, Aisner S, Benevenia J, Patterson F, Hameed M. Expression of cell cycle, angiogenesis and metastases associated factors in osteosarcoma – immunohistochemical of tissue array in 35 patients. *J Clin Oncol.* 2007; 25(18 Supplement 20):A10036. Presented in 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings.

Choong PF, Pritchard DJ, Rock MG, Sim FH, McLeod RA, Unni KK. Low grade central osteogenic sarcoma: A long-term follow up of 20 patients. *Clin Orthop Relat Res.* 1996;(322):198-206.

Clarke MR, Landreneau RJ, Resnick NM, Crowley R, Dougherty GJ, Cooper DL, Yousem SA. Prognostic significance of CD44 expression in adenocarcinoma of the lung. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 1995;48:200-5.

Coebergh JW, Capocaccia R, Gatta G, Magnani C, Stiller CA. Childhood cancer survival in Europe, 1978-1992: the EURO CARE Study. *Eur J Cancer.* 2001;27:671-2.

Combaret V, Lasset C, Frappaz D, Bouvier R, Thiesse P, Rebillard AC, Philip T, Favrot MC. Evaluation of CD44 prognostic value in neuroblastoma: comparison with the other prognostic factors. *Eur J Cancer.* 1995;31:545-9.

Crepaldi T, Gautreau A, Comoglio PM, Louvard D, Arpin M. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cell. *J Cell Biol.* 1997;138:423-34.

Curto M, McClatchey AL. Ezrin: a metastatic detERMinant? *Cancer Cell.* 2004;5:113-4.

Czerniak B. *Bone tumors*. St Louis: C.V. Mosby; 1998. Osteosarcoma; p.128-252.

Dahlin DC, Unni K. Osteosarcoma of bone and its important recognizable varieties. *Am J Surg Pathol.* 1977; 1:61-72.

Dalla-Torre CA, Yoshimoto M, Lee CH, Joshua AM, de Toledo SR, Petrilli AS, Andrade JA, Chilton-MacNeill S, Zielenska M, Squire JA. Effects os THBS3, SPARC and SPPI expression on biological behaviour and survival in patients with osteosarcoma. *BMC Cancer.* 2006;6:237-47.

Davis AM, Bell RS, Goodwin PJ. Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review. *J Clin Oncol.* 1994;12:423-31.

Daw NC, Billups CA, Galindo CR, McCarville MB, Rao BN, Cain AM, Jenkins JJ, Neel MD, Meyer WH. Metastatic Osteosarcoma: results of two consecutive therapeutic trials at St Jude Children's Research Hospital. *Cancer.* 2006;106:403-12.

Delaney TF, Kepka L, Goldberg SI, Hornicek FJ, Gebhardt MC, Yoon SS, Springfield DS, Raskin KA, Harmon DC, Kirsch DG, Mankin HJ, Rosenberg AE, Nielsen GP, Suit HD. Radiation therapy for control of soft-tissue sarcomas resected with positive margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;67:1460-9.

Delepine N, Delepine G, Jasmin C, Desbois JC, Cornille H, Mathe G. Importance of age and methotrexate dosage: prognosis in children and young adults with high-grade osteosarcomas. *Biomed Pharmacother.* 1988;42:257-62.

Delepine N, Delepine G, Bacci G, Rosen G, Desbois JC. Influence of methotrexate dose intensity on outcome of patients with high grade osteogenic osteosarcoma: analysis os the literature. *Cancer.* 1996;78:2127-35.

Deng X, Tannehill-Gregg SH, Nadella M, He G, Levine A, Cao Y, Rosol T. Parathyroid hormone-related protein and ezrin are up-regulated in human lung cancer bone metastases. *Clin Exp Metast.* 2007;24:107-19.

Devaney K, Vinh TN, Sweet DE. Small cell osteosarcoma of bone: an immunohistochemical study with differential diagnostic considerations. *Hum Pathol.* 1993; 24: 1211-25.

Dhaini HR, Thomas DG, Giordano TJ, Johnson TD, Bermann JS, Leu K, Hollenberg PF, Baker LH. Cytochrome P450 CYP3A4/5 expression as a biomarker of outcome in osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 2003;21:2481-3.

Diemel KD, Klippe HJ, Branseheid D. Pulmonary metastasectomy for osteosarcoma: is it justified? *Recent Results Cancer Res.* 2009;179:183-208.

Dunn D, Dehner LP. Metastatic osteosarcoma to lung: a clinicopathologic study of surgical biopsies and resections. *Cancer.* 1977;40:3054-64.

Elliott BE, Meens JA, SenGupta SK, Louvard D, Arpin M. The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res.* 2005;7:365-73.

Elzagheid A, Korkeila E, Bendardaf R, Buhmeida A, Intense cytoplasmic ezrin immunoreactivity predicts poor survival in colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2008;39:1737-43.

Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop.* 1980; (153):106-20.

Enneking WF, Springfield DS. Osteosarcoma. *Orthop Clin North Am.* 1977; 8:785-803.

Fagioli F, Aglietta M, Tienghi A, Ferrari S, Brach del Prever A, Vassallo E, Palmero A, Biasin E, Bacci G, Picci P, Madon E. High-dose chemotherapy in the treatment of relapsed osteosarcoma: an Italian sarcoma group study. *J Clin Oncol.* 2002;20:2150-6.

Ferguson WS, Goorin AM. Current treatment of osteosarcoma. *Cancer Invest.* 2001;19:292-315.

Ferrari S, Bertoni F, Zanella L, Setola E, Bacchini P, Alberghini M, Versari M, Bacci G. Evaluation of P-glycoprotein, HER-2/ErbB-2, p53 and Bcl-2 in primary tumor and metachronous lung metastases in patients with high-grade osteosarcoma. *Cancer.* 2004;100:1936-42.

Ferrari S, Zanella L, Alberghini M, Palmerini E, Staals E, Bacchini P. Prognostic significance of immunohistochemical expression of Ezrin in non-metastatic high-grade osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50:752-6.

Feugeas O, Guriec N, Babin-Boilletot A. Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with Osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 1996;14:467-72.

Finkel MP, Biskis BO, Jinkins PB. Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science.* 1996;151:698-700.

Foukas AF, Deshmukh NS, Grimer RJ, Mangham DC, Mangos EG, Taylor S. Stage IIB osteosarcoma around knee: a study of MMP-9 in surviving tumor cells. *J Bone Joint Surg Br.* 2002; 84:706-11.

Franchi A, Arganini L, Baroni G, Calzolari A, Capanna R, Campanacci D, Caldora P, Masi L, Brandi ML, Zampi G. Expression of transforming growth factor β isoforms in osteosarcoma variants: association of $\text{tgfb}\beta 1$ with high-grade osteosarcomas. *J Pathol.* 1999;185:284-9.

Franzius C, Bielack S, Flege S, Eckardt J, Sciuk J, Jürgens H, Schober O. High-activity samarium-153-EDMTP therapy followed by autologous peripheral blood stem cell support in unresectable osteosarcoma. *Nuklearmedizin.* 2001;40:215-20.

Fraumeni J. Stature and malignant tumors of bone in childhood and adolescence. *Cancer.* 1967;20:967-73.

Fuchs N, Bielack SS, Epler D, Bieling P, Delling G, Körholz D, Graf N, Heise U, Jürgens H, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Weinelt P, Werner M, Winkler K. Long term results of the cooperative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group's protocol COSS-86 of intensive multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs. *Ann Oncol.* 1998;9:893-900.

Fuchs N, Pritchard DJ. Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;(397):40-52.

Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, Sasaki M, Suzuki T, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T. Localization of a novel v-erb-B-related gene, c-erbB-2 on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol.* 1986; 6:955-8.

Gasparini M. High dose ifosfamide alone and combination for solid malignancies in childhood. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986;18(2 Suppl):S18.

Geiger KD, Stoldt P, Schlote W, Derouiche A. Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 2000; 157:1785-93.

Gentet JC, Brunat-Mentigny M, Demaille MC. Ifosfamide and etoposide in childhood osteosarcoma: a phase II study of the French Society of Pediatric Oncology. *Eur J Cancer.* 1997;33:232-7.

German J. Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* 1993;72:393-406.

Gillette JM, Chan DC, Nielsen-Preiss SM. Annexin2 expression is reduced in human osteosarcoma metastases. *J Cell Biochem.* 2004;92:820-32.

Glasser DB, Lane JM, Huvos AG. Survival, prognosis and therapeutic response in osteogenic sarcoma. *Cancer.* 1992;69:698-708.

Goorin A, Baker A, Giese P. No evidence for improved event free survival with presurgical chemotherapy for non-metastatic extremity osteogenic sarcoma: preliminary results of randomized Pediatric Oncology Group trial 8651. [Abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 1995;14:A1420.n.444.

Goorin AM, Harris MB, Bernstein M, Ferguson W, Devidas M, Siegal GP, Gebhardt MC, Schwartz CL, Link M, Grier HE. Phase II/III trial of Etoposide and high dose Ifosfamide in newly diagnosed metastatic osteosarcoma: a pediatric oncology group trial. *J Clin Oncol*. 2002;2:426-33.

Goorin AM, Perez-Atayde A, Gebhardt M. Weekly high-dose methotrexate and doxorubicin for osteosarcoma. The Dana Faber Cancer Institute/The Children's Hospital Study III. *J Clin Oncol*. 1987;5:1178-84.

Goorin AM, Schwartzentruber DJ, Devidas M, Gebhardt MC, Ayala AG, Harris MB, Helman LJ, Grier HE, Link MP; Pediatric Oncology Group. Presurgical chemotherapy compared with immediate surgery and adjuvant chemotherapy for nonmetastatic osteosarcoma: Pediatric Oncology Group Study POG-8651. *J Clin Oncol*. 2003;21:1574-80.

Gorlick R, Anderson P. Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5442-53.

Gorlick R, Huvos AG, Heller G, Aledo A, Beardsley GP, Healey JH, Meyers PA. Expression of HER2/erb-B2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1999;17:2781-8.

Gorlick R, Liao AC, Antonescu C, Huvos AG, Healey JH, Sowers R, Daras M, Calleja E, Wexler LH, Panicek D, Meyers PA, Yeh SD, Larson SM. Lack of correlation of functional scintigraphy with ^{99m}Technetium-Methoxyisobutylisonitrile with histological necrosis following induction chemotherapy or measures of P-glycoprotein expression in high-grade osteosarcoma. *Clin Cancer Res*. 2001;7:3065-70.

Gotoda T, Matsumura Y, Kondo H, Kanamoto A, Watanabe H, Tachomori Y, Nakanishi Y, Kakizoe T. Expression of CD44 variants and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut*. 2000;46:14-9.

Goto M, Miller RW, Ishikawa Y, Sugano H. Excess of rare cancer in Werner syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996;5:239-46.

Grimer RJ. Surgical options for children with osteosarcoma. *Lancet Oncol*. 2005;6:85-92.

Gross SW. The classic: sarcoma of the long bones: based upon a study of one hundred and sixty-five cases. *Clin Orthop Relat Res*. 1975;(111):5-13.

Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med*. 2002;8:128-35.

Guo W, Healey JH, Meyers PA, Ladanyi M, Huvos AG, Bertino JR, Gorlick R. Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma. *Clin Cancer Res*. 1999;5:621-7.

Hansen MF. Genetic and molecular aspects os osteosarcoma. *J Musculoskeletal Neuronal Interact*. 2002;2:554-60.

Hansen MF, Koufos A, Gallie BL, Phillips RA, Fodstad O, Brøgger A, Gedde-Dahl T, Cavenee WK. Osteosarcoma and retinoblastoma: a shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:6216-20.

Hansen MF, Nellisery MJ, Bhatia P. Common mechanisms of osteosarcoma and Paget's disease. *J Bone Miner Res*. 1999;14(2 Suppl):39-44.

Harris MB, Gieser P, Goorin AM, Ayala A, Shochat SJ, Ferguson WS, Holbrook T, Link MP. Treatment of metastatic osteosarcoma at diagnosis: a Pediatric Oncology Group Study. *J Clin Oncol*. 1998;16:3641-8.

Harrison GM, Davies G, Martin TA, Jiang WG, Mason MD. Distribution and expression of CD44 isoforms and ezrin during prostate cancer-endothelium interaction. *Int J Oncol*. 2002;21:935-40.

Herlich P, Pals S, Ponta H. CD44 in colon cancer. *Eur J Cancer*. 1995;31A:1110-2.

Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita S, Tsukita S. Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol*. 1996;135:37-51.

Hoffer FA, Nikanorov AY, Reddick WE, Bodner SM, Xiong X, Jones-Wallace D, Gronemeyer SA, Rao BN, Kauffman WM, Laor T. Accuracy of MR imaging for detecting epiphysal extension of osteosarcoma. *Pediatr Radiol*. 2000;30:289-98.

Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kyfe DW, Weischselbaum RR. *Cancer medicine*. 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. Neoplasms of the bone and soft tissue; p.2503-7.

Holscher H, Bloem J, van der Woude H, Hermans J, Nooy M, Taminiau A, Hogendoorn P. Can MRI predict the histopathological response in patients with osteosarcoma after the first cycle of chemotherapy? *Clin Radiol*. 1995;50:384-90.

Hong S-H, Ren L, Khanna C. Ezrin enhances survival of single metastatic osteosarcoma cells that reach the lung in an AKT-independent manner. *FASEB J*. 2008;22:238-5.

Hopper KD, Moser RP Jr, Haseman DB, Sweet DE, Madewell JE, Kransdorf MJ. Osteosarcomatosis. *Radiology*. 1990;75:233-39.

Humphrey G, Hazel DL, MacLennan K, Lewis I. Expression of CD44 by rhabdomyosarcoma: a new prognostic marker? *Br J Cancer*. 1999;80:918-21.

Hunter KW. Ezrin, a key component in tumor metastasis. *Trends Mol Med*. 2004;10:201-4.

Huvos A. *Bone tumors: diagnosis, treatment and prognosis*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1979.

Huvos A. *Bone tumors: diagnosis, treatment, and prognosis*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1991.

Huvos AG, Rosen G, Marcove RC. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection and prosthetic bone replacement. *Arch Pathol Lab Med*. 1977;101:14-8.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo demográfico 2000*. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/default.shtm>. Acessado em abril 2009.

Ilic I, Manojlovic S, Cepulic M, Orlic D, Seiwerth S. Osteosarcoma and Ewing's sarcoma in children and adolescents: retrospective clinicopathological study. *Croat Med J*. 2004;45:740-5.

Ilmonen S, Vaheri A, Asko-Seljavaara S, Carpen O. Ezrin in primary cutaneous melanoma. *Mod Pathol*. 2005;18:503-10.

Imran H, Enders F, Krailo M, Sim F, Okuno S, Hawkins D, Neglia J, Randall RL, Womer R, Mascarenhas L, Arndt CA. Effect of time to resumption of chemotherapy after definitive surgery on prognosis for non-metastatic osteosarcoma. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91:604-12.

Ivetic A, Ridley AJ. The telling tail of L-selectin. *Biochem Soc Trans*. 2004;32:1118-21.

Jaffe N. Recent advances in the chemotherapy of metastatic osteogenic sarcoma. *Cancer*. 1972;30:1627-31.

Jaffe N, Carrasco H, Taymond K, Ayala A, Eftekhari F. Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer*. 2002; 95:2202-10.

Jaffe N, Gorlick R. High-dose methotrexate in osteosarcoma: let the questions surcease-time for final acceptance. *J Clin Oncol*. 2008;26:4365-66.

Jaffe N, Prudich J, Knapp J, Wang YM, Bowman R, Cangir A, Ayala A, Chuang V, Wallace S. Treatment of primary osteosarcoma with intra-arterial and intravenous high dose methotrexate. *J Clin Oncol*. 1983;7:428-31.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ, American Cancer Society. Cancer Statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*. 2004;54:8-29.

Jesus-Garcia R, Consentino E, Camargo OP, Batista PPR, Croci AT, Korukian M, Kechichian R, Petrilli AS. Tratamento ortopédico do osteossarcoma: Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento do osteossarcoma. *Rev Bras Ortop*. 1996;31:871-8.

Jesus-Garcia R, Seixas MT, Costa SR, Petrilli AS, Laredo JF. Epiphyseal plate involvement in osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(373):32-8.

Joensuu H, Klemi PJ, Toikkanen S, Jalkanen S. Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol*. 1993;143:867-74.

Kabin M, Sichani MM, Taheri D, Chehrei A. Prognostic value of CD44 in renal cell carcinoma. *J Res Med Sci*. 2006;11:252-6.

Kager L, Zoubek A, Pötschger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, Branscheid D, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Winkelmann W, Jundt G, Kabisch H, Reichardt P, Jürgens H, Gadner H, Bielack SS; Cooperative German-Austrian-Swiss Osteosarcoma Study Group. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol.* 2003;21:2011-8.

Kager L, Zoubek A, Kaastner U. Skip metastases in osteosarcoma: Experience of the Cooperative Osteosarcoma Study 3Group. *J Clin Oncol.* 2006;24:1535-41.

Kanke M, Fujii M, Kameyama K, Kanzaki J, Tokumaru Y, Imanishi Y, Tomita T, Matsumura Y. Role of CD44 variant exon 6 in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126:1217-23.

Kaplan E.L, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Statist Assoc.* 1958;53:457-48.

Karjalainen JM, Tammi RH, Tammi MI, Eskelinen MJ, Agren UM, Parkkinen JJ, Alhava EM, Kosma VM. Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. *Am J Pathol.* 2000;157:957-65.

Karplus G, McCarville MB, Smeltzer MP, Spyridis G, Rao BN, Davidoff A, Li CS, Shochat S. Should contralateral exploratory thoracotomy be advocated for children with osteosarcoma and early unilateral pulmonary metastases? *J Pediatr Surg.* 2009;44:665-71.

Kashima T, Nakamura K, Kawaguchi J, Takanashi M, Ishida T, Aburatani H, Kudo A, Fukayama M, Grigoriadis AE. Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int J Cancer.* 2003;104:147-54.

Kaya M, Wada T, Akatsuka T, Kawaguchi S, Nagoya S, Shindoh M, Higashino F, Mezawa F, Okada F, Ishii S. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:572-7.

Kayton M, Huvos A, Casher J, Abramson S, Rosen N, Wexler L, Meyer P, La Quaglia M. Computed tomographic scan of the chest underestimates the number of metastatic lesions in osteosarcoma. *J Pediatr Surg.* 2006;41:200-6.

Kerbel R, Vileria-Petit A, Klement G, Rak J. Accidental anti-angiogenic drugs: anti-oncogene directed signal transduction inhibitors and conventional chemotherapeutic agents as examples. *Eur J Cancer.* 2000;36:11248-57.

Kesselring FO, Penn W. Radiological aspects of classic primary osteosarcoma: value of some radiological investigations: a review. *Diag Imag.* 1982; 51:78-92.

Khanna C, Khan J, Nguyen P, Prehn J, Caylor J, Yeung C, Trepel J, Meltzer P, Helman L. Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res.* 2001;61:3750-9.

Khanna C, Prehn J, Yeung C, Caylor J, Tsokos M, Helman L. An orthotopic model of murine osteosarcoma with clonally related variants differing in pulmonary metastatic potential. *Clin Exper Metastasis.* 2000; 18:261-71.

Khanna C, Wan X, Bose S, Cassaday R, Olomu O, Mendoza A, Yeung C, Gorlick R, Hewitt SM, Helman LJ. The membrane cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med.* 2004;10:182-6.

Kim C, Shin E, Hong S, Chon HJ, Kim HR, Ahn JR, Hong MH, Yang WI, Roh JK, Rha SY. Clinical value of ezrin expression in primary osteosarcoma. *Cancer Res Treat.* 2009; 41:138-44.

Kim HS, Park YB, Oh JH, Jeong J, Kim CJ, Lee SH. Expression of CD44 isoforms correlates with the metastatic potential of osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;(396):184-90.

Kim MS, Lee SY, Cho WH, Song WS, Koh JS, Lee JA, Yoo JY, Jeon DG. Initial tumor size predicts histologic response and survival in localized osteosarcoma patients. *J Surg Oncol.* 2008;97:456-61.

Kim MS, Song WS, Cho WH, Lee S-Y, Jeon D-G. Ezrin expression predicts survival in stage IIB osteosarcomas. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;459:229-36.

Kirkin V, Joos S, Zornig M. The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1644:229-49.

Kobel M, Gradhand E, Zeng K, Schmitt WD, Kriese K, Lantzch T, Wolters M, Dittmer J, Strauss HG, Thomssen C, Hauptmann S. Ezrin promotes ovarian carcinoma cell invasion and its retained expression predicts poor prognosis in ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2006a; 25:121-30.

Kobel M, Langhammer T, Huttelmaier S, Schmitt WD, Kriese K, Dittmer J, Strauss HG, Thomssen C, Hauptmann S. Ezrin expression is related to poor prognosis in FIGO stage I endometrioid carcinomas. *Mod Pathol.* 2006b;19:581-7.

Kreuter M, Bieker R, Bielack SS, Auras T, Buerger H, Gosheger G, Jurgens H, Berdel WE, Mesters RM. Prognostic relevance of increased angiogenesis in osteosarcoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8531-37.

Kuryu M, Ozaki T, Nishida K, Shibahara M, Kawai A, Inoue H. Expression of CD44 variants in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999;124:646-52.

Lafleur EA, Koshkina NV, Stewart J, Jia SF, Worth LL, Duan X, Kleinerman ES. Increased Fas expression reduces the metastatic potential of human osteosarcoma cells. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8114-9.

La Quaglia MP. Osteosarcoma. specific tumor management and results. *Chest Surg Clin N Am.* 1998;8:77-95.

Lee JA, Kim DH, Lim JS, Park KD, Song WS, Lee SY, Jepn DG. The survival of osteosarcoma patients 10 years old or younger is not worse than the survival of older patients: a retrospective analysis. *Cancer Res Treat.* 2007;39:160-64.

Legg J, Isacke CM. Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Curr Biol.* 1998;8:705-8.

Lesley J, Hyman R, Kincade PW: CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol.* 1993;54:271-335.

Leonard P, Sharp T, Henderson S, Hewitt D, Pringle J, Sandison A, Goodship A, Whelan J, Boshoff C. Gene expression array profile of human osteosarcoma. *Br J Cancer.* 2003;89:2284-8.

Lewis IJ, Nooij MA, Whelan J, Sydes MR, Grimer R, Hogendoorn PCW, Memon MA, Weeden S, Uscinska BM, Glabbeke M, Kirkpatrick A, Hauben EI, Craft AW, Taminiau AHM. Improvement in histologic response but not survival in osteosarcoma patients treated with intensified chemotherapy: a randomized phase III trial of the European Osteosarcoma Study. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99:112-8.

Lewis IJ, Weeden S, Machin D, Stark D, Craft AW. Received dose and dose-intensity of chemotherapy and outcome in nonmetastatic extremity osteosarcoma. Euopean Osteosarcoma Group. *J Clin Oncol.* 2000;18:4028-37.

Li FP, Fraumeni JF, JR. Prospective study of a family cancer syndrome. *JAMA.* 1982;247:2692-4.

Link MP. The multi-institutional osteosarcoma study: an update. *Cancer Treat Res.* 1993;62:621-7.

Link MP, Eilberg F. Osteosarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and practice of pediatric oncology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2002. p.1051-89.

Link MP, Goorin AM, Miser AW, Green AA, Pratt CB, Belasco JB, Pritchard J, Malpas JS, Baker AR, Kirkpatrick JA. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med*. 1986;314:1600-6.

Link MP, Goorin AM, Horowitz M. Adjuvant chemotherapy of high-grade osteosarcoma of the extremity. Updated results of the Multi Institutional osteosarcoma Study. *Clin Orthop Relat Res*. 1991;(270):8-14.

Little J. *Epidemiology of childhood cancer*. Lyon: International Agency for Research on Cancer: World Health Organization; 1999. Introduction; p.1-9. [IARC Scientific Publications, 149].

Lukens JN. Progress resulting from clinical trials. solid tumors in childhood cancer. *Cancer*. 1994;74(9 Suppl):2710-8.

Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, Goorin AM, Sallan SE, Sanders SP, Orav EJ, Gelber RD, Colan SD. Female sex and drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *N Engl J Med*. 1995;332:1738-43.

Lipshultz SE. Dexrazoxane for protection against cardiotoxic effects of anthracyclines in children. *J Clin Oncol*. 1996;14:328-31.

Machak GN, Tkachev SI, Solovyev YN, Sinyukov PA, Ivanov SM, Kochergina NV, Ryjgov AD, Tepliakov VV, Bokhian BY, Glebovskaya VV. Neoadjuvant chemotherapy and local radiotherapy for high-grade osteosarcoma of the extremities. *Mayo Clinic Proc*. 2003;78:147-55.

Mahajan A, Woo SY, Kornguth DG, Hughes D, Huh W, Chang EL, Herzog CE, Pelloski CE, Anderson P. Multimodality treatment of osteosarcoma: radiation in high-risk cohort. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50:976-82.

Maitra A, Roberts H, Weinberg AG, Geradts J. Loss of p16 (INK4a) expression correlates with decreased survival in pediatric osteosarcomas. *Int J Cancer*. 2001;95:34-8.

Makitie T, Carpéu O, Vaheri A, Kivelä T. Ezrin as a prognostic indicator and its relationship to tumor characteristics in uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2442-9.

Malawer MM, Helman LJ, O'Sullivan B. Sarcomas of bone. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer principles and practice of oncology*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.1891-910.

Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. c-Met: structure, functions and potencial for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev*. 2003; 22:309-25.

Marinho LC, Patrício FRS, Jesus-Garcia R, Petrilli AS, Odashiro LN, Macedo C, Alves MTS. Clinicopathologic study and KI-67 proliferative marker evaluation in human osteosarcomas. *J Bras Pathol Med Lab*. 2005;41:419-24.

Martin SE, Dwyer A, Kissane JM, Costa J. Small cell osteosarcoma. *Cancer*. 1982;50:990-6.

Martin SE, Ulrich C, Munsell M, Taylor S, Lange G, Bleyer A. Delays in cancer diagnosis in underinsured young adults and older adolescents. *Oncologist*. 2007;12:816-24.

Martin TA, Harrison G, Mansel RE, Jiang WG. The role of the CD44/ ezrin complex in cancer metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003;46:165-86.

Mascarenhas L, Siegel S, Spector L, Arndt C, Femino D, Malogolowkin M. *Malignant bone tumors: cancer in 15- to 29-year-olds in the United States*. p.98-109. (SEER AYA Monograph viii). Available from: http://www.seer.cancer.gov/publications/aya/8_bone.pdf. Acessado em abril de 2009.

Mathew J, Hines JE, Obafunwa JO, Burr AW, Toole K, Burt AD. CD44 is expressed in hepatocellular carcinomas showing vascular invasion. *J Pathol*. 1996;179:74-9.

Matos MA, Pimentel N, Leite AA. Significado prognóstico do tamanho tumoral no osteossarcoma infantil. *Acta Ortop Bras*. 2002;109-14.

Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet*. 1992;340:1053-8.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA. Germ line p53 mutations in a familiar syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990;250:1233-38.

McIntyre JF, Smith-Sorensen B, Friend SH, Kassell J, Borresen AL, Yan YX, Russo C, Sato J, Barbier N, Miser J. Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1994;12:925-30.

McKenna RJ, Schwinn CP, Higinbotham NL. Osteogenic sarcoma in children. *Calif Med*. 1965;103:165-70.

Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nature Rev Cancer*. 2006;6:449-58.

Melo FHM, Junqueira MS, Chammas R. Oncologia básica: mecanismos de invasão e metástases. In: Brentani MM, Coelho FRG, Kowalski LP, editores. *Bases da oncologia*. 2 ed. São Paulo: Lemar; 2003. p.201-26.

Merimsky O, Kollender Y, Inbar M, Meller I, Bickels J. Palliative treatment for advanced or metastatic osteosarcoma. *Isr Med Assoc J*. 2004;6:34-8.

Merimsky O, Meller I, Flusser G, Kollender Y, Issakov J, Weil-Ben-Arush M, Fenig E, Neuman G, Sapir D, Ariad S, Inbar M. Gemcitabine in soft tissue or bone sarcoma resistant to standard chemotherapy: a phase II study. *Cancer Chemoth Pharmacol*. 2000;45:177-81.

Meyers JS, Mackenzie W. Malignant bone tumors and limb-salvage surgery in children. *Pediatr Radiol*. 2004;34:606-13.

Meyers PA. High-dose therapy with autologous stem cell rescue for pediatric sarcomas. *Curr Opin Oncol*. 2004;16:120-5.

Meyers PA, Heller G, Healey JH, Huvos A, Applewhite A, Sun M, LaQuaglia M.. Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation. *J Clin Oncol*. 1993;11:449-53

Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, Marcove R, Applewhite A, Vlamis V, Rosen G.. Chemoterapy for non metastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experince. *J Clin Oncol*. 1992;10:5-15.

Meyers PA, Schwartz CL, Krailo M, Kleinerman ES, Betcher D, Bernstein ML, Conrad E, Ferguson W, Gebhardt M, Goorin AM, Harris MB, Healey J, Huvos A, Link M, Montebello J, Nadel H, Nieder M, Sato J, Siegal G, Weiner M, Wells R, Wold L, Womer R, Grier H.: Osteosarcoma: A randomized, prospective trial of the addition of ifosfamide and/or muramyl tripeptide to cisplatin, doxorubicin, and high-dose methotrexate. *J Clin Oncol*. 2005;23:2004-11.

Meyers PA, Schwartz CL, Krailo MD, Healey JH, Bernstein ML, Betcher D, Ferguson WS, Gebhardt MC, Goorin AM, Harris M, Kleinerman E, Link MP, Nadel H, Nieder M, Siegal GP, Weiner MA, Wells RJ, Womer RB, Grier HE; Children's Oncology Group. Osteosarcoma: The addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2008;26:633-8.

- Meyer T, Hart IR. Mechanism of tumor metastasis. *Eur J Cancer*. 1998;34:213-21.
- Mialou V, Philip T, Kalifa C, Perol D, Gentet JC, Marec-Berard P, Pacquement H, Chastagner P, Defaschelles AS, Hartmann O. Metastatic osteosarcoma at diagnosis – prognostic factors and long-term outcome – The French Pediatric Experience. *Cancer*. 2005;105:1100-9.
- Miller R. Etiology of childhood bone cancer: epidemiologic observations. *Recent Results Cancer Res*. 1976; 54:50-62.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa/2008 incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2007.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Câncer na criança e no adolescente no Brasil: dados dos registros de base populacional e de mortalidade*. Rio de Janeiro: INCA; 2008.
- Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa/2010 incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2009.
- Moilanen J, Lassus H, Leminen A, Vaheri A, Butzow R, Carpén O. Ezrin immunoreactivity in relation to survival in serous ovarian carcinoma patients. *Gynecol Oncol*. 2003;90:273-81.
- Monaghan H, Bubb VJ, Sirimujalin R, Millward-Sadler DM. Adenomatous polyposis coli (APC), beta-catenin and cadherin are expressed in human bone and cartilage. *Histopathology*. 2001;39:611-9.
- Montgomery E, Abraham S, Fisher C, Deasel MR, Amr SS, Sheikh SS, House M, Lilliemoe K, Choti M, Brock M, Ephron DT, Zahuruk M, Chadburn A. CD44c loss in gastric stromal as a prognostic marker. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:168-77.

Morrison H, Herrlich P, Petz U. *Regulation of the tumour suppressor protein merlin*. Available from: [http://www.sfb604.uni-jena.de/Project_C9_\(Morrison\).html](http://www.sfb604.uni-jena.de/Project_C9_(Morrison).html). Acessado em junho 2008.

Nachman J, Simon MA, Deasn L, Shermeta D, Dawson P, Vogelzang NJ. Disparate histologic response in simultaneously resected primary and metastatic osteosarcoma following intravenous neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*. 1987;5:1185-90.

Nadel HR, Stilwell ME. Nuclear medicine topics in pediatric musculoskeletal disease: techniques and applications. *Radiol Clin North Am*. 2001; 39:619-51.

Nakamura H, Ozawa H. Immunolocalization of CD44 and ERM family in bone cells of mouse tibiae. *J Bone Miner Res*. 1996;11:1715-22.

Newton WA Jr, Meadows AT, Shimada H, Bunin GR, Vawter GF. Bone sarcomas as second malignant neoplasm following childhood cancer. *Cancer*. 1991;67:193-201.

Niitsu N, Iijima K. High serum soluble CD44 is correlated with a poor outcome of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia Res*. 2002;26:241-8.

Ochs JJ, Freeman AL, Douglass HO, Higby DS, Mindell ER, Sinks LF. cis-Dichlorodiammineplatinum (II) in advanced osteogenic sarcoma. *Cancer Treat Rep*. 1978;62:239-45.

Ogino W, Takeshima Y, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Akisue T, Kurosaka M, Matsuo M. High level of ezrin mRNA expression in an osteosarcoma biopsy sample with lung metastasis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007;29:435-9.

Okada K, Frassica FJ, Sim FH, Beabout JW, Bond JR, Unni KK. Parosteal osteosarcoma: a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:366-78.

Okada K, Hasegawa T, Nishida J, Ogose A, Tajino T, Osanai T, Yanagisawa M, Hatori M. Osteosarcoma after the age of 50: a clinicopathologic study of 64 case: an experience in northern Japan. *Ann Surg Oncol*. 2004;11:998-1004.

Onda M, Matsuda S, Higaki S, Iijima T, Fukushima J, Yokokura A, Kojima T, Horiuchi H, Kurokawa T, Yamamoto T. Erb-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer*. 1996;77:71-8.

Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herlich P, Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev*. 2002;16:3074-86.

Ornek T, Fadiel A, Tan O, Naftolin F, Arici A. Regulation and activation of ezrin protein in endometriosis. *Hum Reproduct*. 2008;23:2104-12.

Osawa H, Smith CA, Ra YS, Kongham P, Rutka JT. The role of the membrane cytoskeleton crosslinker ezrin in medulloblastoma cells. *Neuro Oncol*. 2009;11:381-93.

Pals ST, Wielenga VJM, Van Der Voort R, Mulder JW, Kruijt PM, Weidema WF, Oosting J, Seldenrijk CA, Van Krimpen C, Offerhaus GJA. CD44 splice variants as prognostic markers in colorectal cancer. *Scand J Gastroenterol*. 1998;33:82-87.

Park DM, Kramarova E, Draper GJ, Masuyer E, Micahelis J, Neglia J. *International incidence of childhood cancer, II*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1998. [IARC Scientific Publications, 87].

Park H-R, Cabrini RL, Araújo ES, Paparella ML, Brandizzi D, Park Y-K. Expression of ezrin and metastatic tumor antigen in osteosarcoma of the jaw. *Tumori*. 2009;95:81-6.

Park H-R, Jung WW, Kim HS, Bacchini P, Bertoni F, Park Y-. Overexpression of metastatic tumor antigen in osteosarcoma: comparison between conventional high-grade and central low-grade osteosarcoma. *Cancer Res Treat*. 2005;37:360-4.

Park H-R, Jung WW, Bacchini P, Bertoni F, Kim Y-W, Park Y-K. Ezrin in osteosarcoma: comparison between conventional high-grade and central low-grade osteosarcoma. *Pathol Res Pract*. 2006;202:509-15.

Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J. International variations in the incidence of childhood bone tumors. *Int J Cancer*. 1993;53:371-6..

Peng TS, Qiu JS, Wu HX, Liang HZ, Luo CQ. Expressions of CD44s, MMP-9, and Ki-67: possible association with invasion, metastasis, and recurrence of osteosarcoma. *Ai Zheng*. 2002;21:745-50.

Penna V, Lopes A, Tanaka MH, Chung WT, Melaragno R, Epelman S. Osteossarcoma: tratamento multidisciplinar. *Rev Bras Ortop*. 1993;28:791-94.

Pereira MG. *Epidemiologia: teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. Variáveis relativas a pessoas; p.192-3.

Perlman EJ, Dickman OS, Askin FB, Grier HE, Miser JS, Link MP. Ewing's sarcoma – routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: a Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study. *Hum Pathol*. 1994;25:304-7.

Peterson LFA, Brown AL, Janes JM. The ultrastructure of beryllium-induced osteogenic sarcoma in the rabbit. *J Bone Joint Surg*. 1964; 46A:920.

Petrilli AS, de Camargo B, Odone FV, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, Camargo OP, Pena W, Péricles P, Davi A, Prospero JD, Alves MT, Oliveira CR, Macedo CR, Mendes WL, Almeida MT, Borsato ML, dos Santos TM, Ortega J, Consentino E; Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol*. 2006;24:1161-8.

Petrilli AS, Gentil FC, Epelman S, Lopes LF, Bianchi A, Lopes A, Figueiredo MT, Marques E, De Bellis N, Consentino E, Increased survival, limb preservation and prognostic factors for osteosarcoma. *Cancer*. 1991a; 68:733-7.

Petrilli AS, Kechichian R, Broniscer A, Garcia RJ, Tanaka C, Francisco J, Lederman H, Odone Filho V, Camargo OP, Bruniera P, Pericles P, Consentino E, Ortega JA. Activity of intraarterial carboplatin as a single agent in the treatment of newly diagnosed extremity osteosarcoma. *Med Ped Oncol*. 1999;33:71-5.

Petrilli AS, Oliveira DT, Ginani VC, Kechichian R, Dishtchekenian A, Filho WDE M, Tanaka C, Dias CG, Latorre MDO R, Brunetto AL, Cardoso H, Almeida MT, de camargo b. Use of amifostine in the therapy of osteosarcoma in children and adolescents. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002;24:188-91.

Petrilli AS, Pena V, Lopes A, Figueiredo MT, Gentil FC. IIB osteosorcoma. Current management, local control, and survival statistics-São Paulo, Brazil. *Clin Orthop Relat Res*. 1991b;(270)60-6.

Picci P, Capanna R, Bacci G, Mercuri M, Biagini R, Ruggieri P, Ferraro A, De Cristofaro R, Ferruzzi A, Campanacci M: Margins, necrosis and local recurrence after conservative surgery in osteosarcoma. *Chir Organi Mov*. 1990; 75:82-5.

Picci P, Sangiorgi L, Rougraff BT, Neff JR, Casadei R, Campanacci M. Relationship of chemotherapy-induced necrosis and surgical margins to local recurrence in osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1994; 12:2699-705.

Picci P, Sangiorgi L, Bahamonde L, Aluigi P, Bibiloni J, Zavatta M, Mercuri M, Briccoli A, Campanacci M.. Risk factors for local recurrences after limb salvage surgery for high-grade osteosarcomas of the extremities. *Ann Oncol*. 1997;8:899-903.

Picci P, Vanel D, Briccoli A, Talle K, Haakenaasen U, Malaguti C, Monti C, Ferrari C, Bacci G, Saeter G, Alvegard TA. Computed tomography of pulmonary metastases from osteosarcoma: The less poor technique. A study of 51 patients with histological correlation. *Ann Oncol*. 2001;12:1601-4.

Pritchard DJ, Finkel MP, Reilly CA. The etiology of osteosarcoma: a review of current considerations. *Clin Orthop*. 1975;(111):14-22.

Ragland BD, Bell WC, Lopez RR, Siegal GP. Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma. *Lab Invest.* 2002;82:365-73.

Raymond AK, Ayala AG, Knuuti LA. *Conventional osteosarcoma*. In: Fletcher CFM, Unni KK, Martens F, editor. *WHO Classification of Tumours – Tumours of Soft Tissues and Bone*. Lyon: IARC Press; 2002. p.264-85.

Raymond AK, Chawla SP, Carrasco CH, Ayala AG, Fanning CV, Grice B, Armen T, Plager C, Papadopoulos NE, Edeiken J. Osteosarcoma chemotherapy effect: a prognostic factor. *Semin Diagn Pathol.* 1987;4:212-36.

Rech A, Castro CG JR, Mattei J, Gregianin L, Di Leone L, David A, Rivero LF, Tarrago R, Abreu A, Brunetto AL. Clinical features in osteosarcoma and prognostic implications. *J Pediatr (Rio J).* 2004;80:65-70.

Refaat Y, Gunnoe J, Hormicek FJ, Mankin HJ. Comparison of quality of life after amputation or limb salvage. *Clin Orthop.* 2002; 397:298-305.

Ren L, Hong SH, Cassavaugh J, Osborne T, Chou AJ, Kim SY, Gorlick R, Hewitt SM, Khanna C. The actin-cytoskeleton linker protein ezrin is regulated during osteosarcoma metastasis by PKC. *Oncogene.* 2009;28:792-802.

Ristamak R, Joensu H, Hagberg H, Kalkner KM, Jalkanen S. Clinical significance of circulating CD44 in non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer.* 1998;79:221-5.

Ritts GD, Pritchard DJ, Unni KK, Beabout JW, Eckardt JJ. Periosteal osteosarcoma. *Clin Orthop.* 1987;(219):299-307.

Roa Estério I, Villaseca HMA, Araya Oróstica JC, Roa SJC, De Aretxabala Urquiza X, Ibacache SG, Garcia V. Expresson de CD44 HCAM em El carcinoma subseroso de La vesícula biliar. *Rev Med Chil.* 2001;129:727-34.

Rodrigues KES, de Camargo B. Diagnóstico precoce do câncer infantil: responsabilidade de todos. *Rev Assoc Med Bras*. 2003;49:29-34.

Rosenberg AE. Bones, joints and soft tissue tumors. In: Kumar VK, Abbas AK, Fausto N, editors. *Robbins and Cotran pathologic basis of the disease*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.1273-324.

Rossi BM, Lopes A, Kowalski LP, Regazzini RCO. Prognostic factors in 291 patients with pulmonary metastases submitted to toracotomy. *Sao Paulo Med J*. 1995;113:910-6.

Rubert CK, Mlawer MM, Kellar KL. Modular endoprothetic replacement of the proximal humerus: indications, surgical technique, and results. *Semin Arthroplasty*. 1999;10:142-53.

Saeter G, Alvegard TA, Elomaa I, Stenwig AE, Holmstrom T, Solheim OP. Treatment of osteosarcoma of the extremities with the T-10 protocol, with emphasis on the effects of preoperative chemotherapy with single agent high-dose methotrexate: a Scandinavian Sarcoma Group Study. *J Clin Oncol*. 1991;9:1766-75.

Salas S, Bartoli C, Deville JL, Gaudart J, Fina F, Calisti A, Bollini G, Curvale G, Gentet JC, Duffaud F, Figarella-Branger D, Bouvier C. Ezrin and alpha-smooth muscle actin are immunohistochemical prognostic markers in conventional osteosarcomas. *Virchow Arch*. 2007; 451:999-1007.

Salas S, de Pinieux G, Gomez-Brouchet A, Larrousserie F, Leroy X, Aubert S, Decouvelaere AV, Giorgi R, Fernandez C, Bouvier C. Ezrin immunohistochemical expression in cartilaginous tumours: a useful tool for differential diagnosis between chondroblastic osteosarcoma and chondrosarcoma. *Virchow Arch*. 2009;454:81-7.

Salzer-Kuntschik M, Delling G, Beron G, Sigmund R. Morphological grades of regression in osteosarcoma after polychemotherapy – study COSS 80. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1983;106:171-216.

Sanders RP, Drissi R, Billups CA, Daw NC, Valentine MB, Dome JS. Telomerase expression predicts unfavorable outcome in osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 2004; 22:3790-7.

Sarrió D, Rodriguez-Pinilla SM, Dotor A, Calero F, Hardisson D, Palacios J. Abnormal ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;98:71-9.

Sauerbrey A, Bielack S, Kempf-Bielack B, Zoubek A, Paulussen M, Zintl F. High-dose chemotherapy (HDC) and autologous hematopoietic stem cell transplantation (ASCT) as salvage therapy for relapsed osteosarcoma. *Bone Marrow Transplant.* 2001;27:933-7.

Scully SP, Ghert MA, Zurakowski D, Thompson RC, Gebhardt MC. Pathologic fracture in osteosarcoma - prognostic importance and treatment implications. *Clin Orthop Relat Res.* 2000;373:32-8.

Serra M, Maurici D, Scotlandi K, Barbanti-Brodano G, Manara MC, Benini S, Picci P, Bertoni F, Bacci G, Sottili S, Baldini N. Relationship between P-glycoprotein expression and p53 status in high grade osteosarcoma. *Int J Oncol.* 1999;14:301-7.

Shapiro LQ, Bruce BG, Hewitt SM, Mc Clatchey AI, Bretscher A, Khanna C. Merlin-ezrin interactions in the metastatic outcome of osteosarcoma [Abstract #4301]. *Proc Amer Assoc Cancer Res.* 2006;47:1010.

Simon R. Clinical prognostic factors in osteosarcomas. *Cancer Treat Rep.* 1978;62:193-7.

Smeland S, Müller C, Alvegard TA, Wiklund T, Wiebe T, Björk O, Stenwig AE, Willén H, Holmström T, Follerås G, Brosjö O, Kivioja A, Jonsson K, Monge O, Saeter G. Scandinavian Sarcoma Group Osteosarcoma Study SSG VIII: prognostic factors for outcome and the role of replacement salvage chemotherapy for poor histological responders. *Eur J Cancer.* 2003;39:488-94.

Smith MA, Ungerleider RS, Horowitz ME, Simon R. Influence of doxorubicin dose intensity on response and outcome for patients with osteogenic sarcoma and Ewing's sarcoma. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83:1460-70.

Sobin LH, Wittekind CH. *TNM classification malignant tumors*. 6ªed. New York: John Wiley & Sons 2002. Tumors of bone and soft tissues; p.109-13.

Spanier SS, Shuster JJ, Vander Griend RA. The effect of local extent of the tumor on prognosis in osteosarcoma. *J Bone Joint Surg Am.* 1990;72:643-53.

Spremulli EN, Dexter DL. Human tumor cell heterogeneity and metastasis. *J Clin Oncol.* 1983;1:496-509.

Stiller CA, Craft AW, Corazziari I. EUROCORE Working Group. Survival of children with bone sarcoma in Europe since 1978: results from the EUROCORE study. *Eur J Cancer.* 2001;37:760-6.

Sulzbacher I, Birner P, Toma C, Wick N, Mazal PR. Expression of c-kit in human osteosarcoma and its relevance as prognostic parameter. *J Clin Pathol.* 2007;60:804-7.

Sung-Hyeok H, Ling R, Chand K. Ezrin enhances survival of single metastatic osteosarcoma cells that reach the lung in an AKT-independent manner. *FASEB J.* 2008;22:238.5.

SEER. Surveillance, Epidemiology, and end Results Program. *Cancer epidemiology in older adolescents and young adults 15 to 29 years of age, including SEER incidence and survival: 1975-2000*. Available form: <http://seer.cancer.gov/publications/aya>. Acessado em setembro 2009.

Tabone MD, Kalifa C, Raquin M, Valteau-Couanet D, Lemerle J. Osteosarcoma recurrences in pediatric patients previously treated with intensive chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1994;12:2614-20.

Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet*. 1993;341:725-6.

Tanaka MH, Panna V, Chung WT, Lopes A. Tumores malignos dos ossos. *Arq Cat Med*. 1997;26:18-21.

Taylor WF, Ivins JC, Dahlin DC, Edmonson JH, Pritchard DJ. Trends and variability in survival from osteosarcoma. *Mayo Clinic Proc*. 1978;53:695-700.

Taylor WF, Ivins JC, Pritchard DJ, Dahlin DC, Gilchrist GS, Edmonson JH. Trends and variability in survival among patients with osteosarcoma: a 7-year update. *Mayo Clin Proc*. 1985;60:91-104.

Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B, Beauchamp RL, Dayton SH, Herrera GE, Yamamuro T, Kotoura Y, Sasaki MS, Little JB Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas, *Cancer Res*. 1992;52:6194-9.

Tsuchiya H, Kanazawa Y, Abdel-Wanis ME, Asada N, Abe S, Isu K, Sugita T, Tomita K. Effect of timing of pulmonary metástases identification on prognosis of patients with osteosarcoma: the japanese musculoskeletal Oncology group study. *J Clin Oncol*. 2002; 20:3470-7.

Tsukita S, Oishi K, Sato N, Sagara J, Kawai A, Tsukita S: ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J Cell Biol*. 1994;126:391-401.

Tsukita S, Yonemura S. ERM family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:70-5.

Tunn PU, Reichardt P. Chemotherapy for osteosarcoma without high dose methotrexate: a 12-year follow up on 53 patients. *Onkologie*. 2007;30:228-32.

Tynninen O, Carpen o, Jaaskelainen J, Paavonen T, Paetau A. Ezrin expression in tissue microarray of primary and recurrent gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2004;30:472-7.

Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HF, Schaafsma HE, Debruyne FM, Isaacs WB. Expression of the cellular adhesion molecule E-caderin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer Res.* 1992;52:5104-9.

Unni KK, Dahlin DC. Premalignant tumors and conditions of bone. *Am J Surg Pathol.* 1979;3:47-60.

Unni KK. *Dahlin's bone tumors: general aspects and data on 11.087 cases.* 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. Osteosarcoma; p.143-84.

Uribe-Botero G, Russel WO, Lutow WW, Martin RG. Primary osteogenic of bone a clinic-pathologic investigation of 243 cases with necropsy studies in 54 cases. *Am J Clin Pathol.* 1977;74:427-35.

Vaheri A, Carpen O, Heiska L, Helander TS, Jaakelainen J, Majander-Nordenswan P, Sainio M, Timonem T, Turnem O. The ezrin protein family: membrane-cytoskeleton interactions and disease associations. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:659-66.

Valdman A, Fang X, Pang S, Nilsson B, Ekman P, Egevad L. Ezrin expression in prostate cancer and benign prostatic tissue. *Eur Urol.* 2005;48:852-7.

Van Dalen EC, de Camargo B. Methotrexate for high-grade osteosarcoma in children and young adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(1):CD006325.

Varela-Duran J, Dehner LP. Postirradiation osteosarcoma in childhood: a clinicopathologic study of three cases and review of the literature. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 1980;2:263-71.

- Yan G, Zhou X, Xiao X, Lu H, Du X. Ezrin expression and its translocation in human primary sporadic colorectal carcinoma and prognostic significance. *Chinese-German J Clin Oncol.* 2007; 6:1610-9.
- Yang Y, Du H, Huang P, Wang J, Zhang G, Xu Z. XIAP expression and its predictive significance os prognosis in stage IIB osteosarcomas. *Chinese-German J Clin Oncol.* 2008; 7:416-9.
- Yonemura S, Hirao M, Doi Y, Takahashi N, Kondo T, Tsukita S, Tsukita S. Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic comain of CD44, CD43and ICAM-2. *J Cell Biol.* 1998;140:885-95.
- Yu Y, Khan J, Khanna C, Helman L, Meltz PS, Merlino G. Expression profiling identifies the cytoskelethal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat Med.* 2004;10:175-81.
- Wang HJ, Cortes E, Sinks LF, Holland JF. Therapeutic effect and toxicity of adriamycin in patients with neoplastic disease. *Cancer.* 1971;28:837-43.
- Wang HJ, Zhe JS, Zhang Q, Sun Q, Guo H. High level of ezrin expression in colorectal cancer tissues is closely related to tumor malignancy. *World J Gastroenterol.* 2009;15:2016-19.
- Wang LL, Gannavarapu A, Kozinetz CA, Levy ML, Lewis RA, Chintagumpala MM, Ruiz-Maldonado R, Contreras-Ruiz J, Cunniff C, Erickson RP, Lev D, Rogers M, Zackai EH, Plon SE Association between osteosarcoma and deleterious mutations in the RECQL4 gene in Rothumund-Thompson syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:669-74
- Wang X, Mendoza A, Khanna C, Helman LJ. Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res.* 2005;65:2406-11.

Wang X, Zucherman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H, Xu X. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA*. 2002;287:195-202.

Wan X, Mendoza A, Khanna C, Helman F. Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in murine model of osteosarcoma. *Cancer Res*. 2005;65:2406-11.

Weber GF, Bronson RT, Ilagan J, Cantor H, Schmits R, Mak TW. Absence of the CD44 gene prevents sarcoma metastasis. *Cancer Res*. 2002;62(8):2281-6.

Wei H, Zhao MQ, Dong W, Yang Y, Li JS. Expression of c-kit protein and mutational status of the c-kit gene in osteosarcoma and their clinicopathological significance. *J Int Med Res*. 2008;36:1008-14.

Weiner MA, Harris MB, Lewis M, Jones R, Sherry H, Feurer EJ, Johnson J, Lahman E. Neoadjuvant high-dose methotrexate, cisplatin and doxorubicin for the management of patients with nonmetastatic osteosarcoma. *Cancer Treat Rep*. 1986;70:1431-2.

Weng EH, Ahlen J, Astrom K, Lui W-O, Larsson C. Prognostic impact of immunohistochemical expression of ezrin in highly malignant soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2005.

Wensel TM, Kehr H. Osteosarcoma and dose-intensive chemotherapy. *US Pharm*. 2008;33:508.

Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, Bielack S, Pratt CB, Ferrari S, Bacci G, Craft AW, Adamson PC. High-dose methotrexate induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma: incidence, treatment and outcome. *Cancer*. 2004;100:2222-9.

Winkler K, Beron G, Kotz R, Salzer-Kuntschik M, Beck J, Beck W, Brandeis W, Ebell W, Erttmann R, Göbel U. Neoadjuvant chemotherapy for osteogenic sarcoma: results of a cooperative German/Austrian study, *J Clin Oncol*. 1984;2:617-24.

Winkler K, Beron G, Delling G, Heise U, Kabisch H, Purfurst C, Berger J, Ritter J, Jurgens H, Gerein V. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma: results of a cooperative trial (COSS-82) with salvage chemotherapy based on histological tumor response. *J Clin Oncol.* 1988; 6:329-37.

Winkler K, Bielack S, Delling G, Salzer-Kuntschik M, Kotz R, Greenshaw C, Jürgens H, Ritter J, Kusnierz-Glaz C, Erttmann R, Effect of intra arterial versus intravenous cisplatin in addition to systemic doxorubicin, high-dose methotrexate and ifosfamide on histologic tumor response in osteosarcoma (study COSS-86). *Cancer.* 1990;66:1703-10.

Wittig JC, Bickels J, Priebat D, Jelinek J, Kellar-Graney K, Shmookler B, Malawer MM. Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *Am Fam Phys.* 2002;65:1123-32.

Wolf RE, Enneking WF. The staging of musculoskeletal neoplasms. *Orthop Clin North Am.* 1996;27:473-81.

Won KY, Park HR, Park YK. Prognostic implication of immunohistochemical Runx2 expression in osteosarcoma. *Tumori.* 2009;95:311-6.

Worth LL, Lafleur EA, Jia SF, Kleinerman ES. Expression in versely correlates with metastatic potential in osteosarcoma cell. *Oncol Rep.* 2002;9:823-7.

Wu PK, Chen WM, Chen CF, Lee OK, Haung CK, Chen TH. Primary osteogenic sarcoma with pulmonary metastasis: clinical results and prognostic factors in 91 patients. *Japanese J Clin Oncol.* 2009;39:514-22.

Xu-Dong S, Zan S, Shui-er Z, Li-na T, Wen-xi Y, Feng L, Yang Y. Expression of Ezrin correlates with lung metastasis in Chinese patients with osteosarcoma. *Clin Invest Med.* 2009;32:180-8.

Zelcer S, Kellick M, Wexler LH, Gorlick R, Meyers PA. The Memorial Sloan Kettering Cancer Center experience with outpatient administration of high dose methotrexate with leucovorin rescue. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;50:1176-80.

Zohar R, Suzuki N, Suzuki K, Arora P, Glogauer M, McCulloch CAG, Sodek J. Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J Cell Physiol*. 2000;184:118-30.