

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA E DA  
FREQUÊNCIA DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE  
c-erbB-2, E-CADERINA, PAN-CADERINA,  $\beta$ -CATENINA E APC,  
EM PACIENTES PORTADORES DE OSTEOSSARCOMAS  
CONVENCIONAIS DE EXTREMIDADES**

**ANDRÉA PAIVA GADÊLHA GUIMARÃES**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Fernando Augusto Soares**

**São Paulo**

**2005**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa  
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Guimarães, Andréa Paiva Gadêlha

**Estudo da correlação clínico-patológica e da frequência da expressão imunoistoquímica de c-erbB-2, E-Caderina, Pan-Caderina,  $\beta$ -Catenina e APC, em pacientes portadores de osteossarcomas convencionais de extremidades.** / Andréa Paiva Gadêlha Guimarães. -- São Paulo, 2005.

134p.

Dissertação(mestrado)–Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares.

Descritores: 1.OSTEOSSARCOMA/epidemiologia. 2.PROTEINA c-erbB-2. 3. CADERINA-E. 4. CADERINA-P. 5. GENES APC.

## **DEDICATÓRIA**

**A Eduardo, meu filho, maior fonte de alegria, motivo de inspiração e incentivo para a vida.**

**A meus pais, Fernando e Zenaide, pelo exemplo de vida, carinho, incentivo e apoio incondicional em todos os momentos.**

**Aos meus irmãos, Flávio e Cristiane, pela amizade, incentivo e amor.**

**A Gustavo, meu querido marido, pelo apoio, companheirismo, paciência, dedicação e carinho fundamentais para realização deste trabalho e de tudo que faço.**

**Ao Hospital do Câncer e seus pacientes, responsáveis diretos pela minha formação e principal objetivo deste trabalho.**

## **AGRADECIMENTOS**

**Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, Diretor do Departamento de Anatomia Patológica, meu orientador e grande incentivador, pela eficiência, dedicação e amizade que tornou possível a realização desta dissertação, além de um exemplo a ser seguido.**

**Ao Dr. Paulo Eduardo Pizão pelo incentivo, orientação, confiança e amizade dedicados durante a execução deste trabalho.**

**Ao Prof. Dr. Ademar Lopes pelo grande apoio, carinho, e pelas idéias que influenciaram no início deste trabalho.**

**A Dra. Isabela Werneck da Cunha pelo carinho, dedicação e disponibilidade que foram de grande importância para a conclusão deste trabalho.**

**Aos colegas do Departamento de Oncologia Clínica pela amizade, incentivo e companheirismo diário nas tarefas do departamento.**

**Aos colegas do Departamento de Pediatria em especial a Dra. Beatriz Camargo e ao Dr. Wellington pelo incentivo, enriquecedora troca de idéias e apoio nesta empreitada e pelos dados de pacientes fornecidos para enriquecer este trabalho.**

**Aos colegas da Cirurgia Pélvica, pelo carinho, apoio e sugestões e pelos pacientes cedidos para este trabalho.**

**Ao Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani, ex-residente do Hospital do Câncer pela amizade, ajuda na interpretação dos dados estatísticos e troca de experiências que muito colaboraram na realização deste trabalho.**

**Ao Dr. André Lopes Carvalho pelo apoio, amizade e ajuda no melhor entendimento dos dados estatísticos.**

**Ao Dr. Sandro Martins pela amizade, e pelas dicas para melhor elaboração e clareza desta tese.**

**A Sra. Hirde Contesini, pela colaboração, dedicação e ajuda no levantamento dos prontuários por meio do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME).**

**A Sra. Suely Francisco, bibliotecária do Hospital do Câncer, pelas sugestões, orientações e revisão desta dissertação e carisma que exalta as suas qualidades.**

**As Sra. Rosinéia Aguiar Carneiro, Sra. Francyne Polen Gomes de Lima e Srta. Maria Adriana Martins Bassoli, funcionárias da biblioteca do Hospital do Câncer, pela presença constante, eficiência e disponibilidade em ajudar sempre que necessário.**

**A Edival, meu sogro e Anna, minha sogra, pelo carinho, apoio e estarem sempre prontos a ajudar-nos.**

## RESUMO

Guimarães, APG. **Estudo da correlação clínico-patológica e da frequência da expressão imunohistoquímica de c-erbB-2, E-caderina, Pan-caderina,  $\beta$ -catenina e APC em pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades não convencionais.** São Paulo, 2005 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

**Introdução:** Osteossarcoma é o tumor ósseo maligno mais freqüente na criança e adulto jovem, cujo tratamento a partir dos anos 70 consiste em cirurgia e quimioterapia. Atualmente mesmo no grupo de pacientes sem doença metastática ao diagnóstico as taxas de cura estão entre 60 e 70% e naqueles com doença metastática ao diagnóstico entre 10 a 15%. Fatores clínicos e anatomopatológicos tradicionais são em geral insuficientes para prever evolução e resposta tumoral, estudos de novos fatores prognósticos imunohistoquímicos e moleculares estão sendo realizados para auxiliar na seleção de pacientes de risco e realização de terapêutica mais efetiva com menor toxicidade. **Objetivos:** Analisar a associação entre a expressão imunohistoquímica do c-erbB-2, Pan-caderina, E-caderina,  $\beta$ -catenina, APC e fatores clínico-demográficos, anatomopatológicos e relacionados ao tratamento. Identificar fatores prognósticos. Correlacionar o padrão de imunorreatividade destes marcadores imunohistoquímicos com a sobrevida global e livre de doença. Tentar identificar grupos de risco, com base nas variáveis com valor prognóstico. **Pacientes e Métodos:** Foram avaliados retrospectivamente 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidade metastáticos ou não ao diagnóstico, com confirmação anatomopatológica, tratados com cirurgia e/ou quimioterapia na Fundação Antonio Prudente no período entre 1985 a 2000, com disponibilidade dos blocos de parafina do tumor primário e material adequado para novos cortes e estudo imunohistoquímico. **Resultados:** Não houve associação estatisticamente significativa entre os fatores clínico-demográficos e anatomopatológicos com a expressão imunohistoquímica de c-erbB-2, Pan-caderina, E-caderina,  $\beta$ -catenina. Apenas a imunorreatividade do APC se associou a idade ( $p=0,025$ ). As variáveis Pan-caderina ( $p=0,016$ ), período da cirurgia ( $p=0,004$ ) e raça ( $0,037$ ) foram consideradas estatisticamente significantes na análise multivariada para a sobrevida livre de doença. E para a sobrevida global a imunorreatividade da Pan-caderina e a interação das variáveis APC/quimioterapia pós-operatória foram significantes ( $p=0,012$  e  $p< 0,001$ ) respectivamente. **Conclusão:** Dos marcadores imunohistoquímicos apenas o APC apresentou correlação com dados clínicos. A imunorreatividade do APC se correlacionou com a idade ( $p=0,025$ ), onde se observou maior

perda da expressão do APC (APC negativo) em pacientes maiores de 18 anos. Apesar da pequena casuística, a imunorreatividade negativa da Pan-caderina foi uma variável significativa para a sobrevida livre de doença (02 casos,  $p < 0,001$ ) e global (03 casos,  $p < 0,001$ ). A interação das variáveis imunorreatividade do APC e quimioterapia pós-operatória permitiu identificar grupos prognósticos, onde o grupo APC positivo e que realizou quimioterapia pós-operatória apresentou maior sobrevida. Enquanto aqueles com APC positivo sem quimioterapia pós-operatória apresentaram prognóstico tão reservado quanto aqueles com perda da expressão do APC independente da quimioterapia. Como a literatura que associa estes marcadores Pan-caderina e APC com osteossarcoma é pobre, esses achados são importantes por estratificar grupos prognósticos. Assim poderemos oferecer uma terapêutica mais individualizada, mais agressiva no grupo de maior risco e poupar de maior toxicidade aqueles de menor risco. Para validação destes dados, estudos prospectivos, com maiores casuísticas são necessários.

## SUMMARY

Guimarães APG. [Study on clinical-pathological correlation and frequency of immunohistochemical expression of c-erbB-2, E-cadherin, pan-cadherin,  $\beta$ -catenin, and APC in patients with non-conventional osteosarcoma of the extremities]. São Paulo; 2005 [Dissertação de mestrado-Fundação Antonio Prudente]

**Background:** Osteosarcoma is the most frequent malignant bone tumor in children and young adults. Since 1970's its treatment consists of surgery and chemotherapy. Nowadays, among patients with no metastatic disease at diagnosis cure rates are between 60-70% but they drop to 10-15% among those with metastatic disease. Traditional clinical and pathological factors are usually insufficient to predict evolution and tumor response. Studies on new immunohistochemical and molecular prognostic factors have been realized in order to aid in the selection of patients at risk that should be submitted to more effective therapy with low toxicity. **Objective:** To analyze the association between immunohistochemical expression of c-erbB-2, E-cadherin, pan-cadherin,  $\beta$ -catenin, and APC and clinical-demographic, pathological factors and related to therapy. To identify prognostic factors and to correlate the immunoreactivity of these immunohistochemical markers with overall and disease-free survival. To try to identify risk groups based on variables with prognostic value. **Patients and methods:** Ninety-seven patients diagnosed with metastatic and non-metastatic osteosarcoma of the extremity were evaluated. Diagnoses were confirmed by pathological examination and patients were treated with surgery and/or chemotherapy from 1985 to 2000 at the Fundação Antonio Prudente. Paraffin-embedded tissues from primary tumor are available for further immunohistochemical studies. **Results:** There was no statistically significant association between clinical-demographic and pathological factors with immunohistochemical expression of c-erbB-2, E-cadherin, pan-cadherin, and  $\beta$ -catenin. Only immunoreactivity of APC was associated with age ( $p = 0.0025$ ). The variables pan-cadherin ( $p = 0.016$ ), period of surgery ( $p = 0.004$ ), and race ( $p = 0.037$ ) were considered statistically significant in a multivariable analysis for disease-free survival. For overall survival, pan-cadherin immunoreactivity and interaction of APC/post-operative chemotherapy variables were significant ( $p = 0.012$  and  $p < 0.001$ , respectively). **Conclusion:** APC was the only immunohistochemical marker that presented correlation with clinical data. Its immunoreactivity was correlated with age ( $p = 0.0025$ ), where a major loss of APC expression (negative APC) was observed in patients over 18 years old. Despite this little



casuistic, negative immunoreactivity of pan-cadherin was a significant variable related to disease-free and overall survival ((2 cases,  $p < 0.001$ ; 3 cases,  $p < 0.001$ , respectively). Interaction between APC immunoreactivity and post-chemotherapy variables allowed the identification of prognostic groups, where positive APC group, that also received post-operative chemotherapy, presented higher survival rate. Patients with positive APC who did not receive post-operative chemotherapy presented a reserved prognosis such as those with loss of APC expression, independently of chemotherapy. Considering that literature associating pan-cadherin and APC markers with osteosarcoma is poor, such findings are important in order to stratify prognostic groups. Thus it is possible to offer a more individualized therapy that can be more aggressive to high-risk patients, whereas it prevents from toxicity those considered as low-risk. To validate data presented here, other prospective studies with a larger number of cases are necessary.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Sítios anatômicos mais freqüentes de osteossarcoma.	9
<b>Figura 2</b>	Estadiamento TNM (Classificação Clínica)/ 2002	24
<b>Figura 3</b>	Localização subcelular e funções das maiores classes de genes associados ao câncer	42
<b>Figura 4</b>	O complexo de adesão celular mediado pelas caderinas	43
<b>Figura 5</b>	O papel do APC na regulação da estabilidade e função da $\beta$ -catenina.	49
<b>Figura 6</b>	Modelo esquemático de fases da via de transdução de sinal do fator de crescimento.	52
<b>Figura 7</b>	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade subtipo osteoblástico. Hematoxilina-eosina, aumento 200x.	62
<b>Figura 8</b>	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade subtipo condroblástico.	63
<b>Figura 9</b>	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade subtipo fibroblástico.	64
<b>Figura 10</b>	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação nuclear pelo APC.	67
<b>Figura 11</b>	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação citoplasmática pelo APC.	68
<b>Figura 12</b>	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação citoplasmática pela $\beta$ -catenina.	68
<b>Figura 13</b>	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação nuclear pela $\beta$ -catenina.	69
<b>Figura 14</b>	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação de membrana pelo c-erbB-2.	69
<b>Figura 15</b>	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação de membrana pelo Pan-caderina.	70
<b>Figura 16</b>	Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação negativa pela E-caderina.	70
<b>Figura 17</b>	Freqüência dos tipos de quimioterapia pré-operatória (%)	77
<b>Figura 18</b>	Freqüência dos tipos de quimioterapia pós-operatória (%)	78
<b>Figura 19</b>	Curva de sobrevida livre de doença para os 83 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades livres de metástase ao diagnóstico.	87

- Figura 20** Curva de sobrevida Global para os 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades. **91**
- Figura 21** Curva de sobrevida global de acordo com os grupos da interação imunorreatividade do APC com quimioterapia pós-operatória em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades **95**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação de osteossarcoma de acordo com a OMS (2002)	<b>20</b>
<b>Tabela 2</b>	Tipos histológicos de osteossarcoma não convencionais, definição e sinonímia, segundo OMS (2002).	<b>21</b>
<b>Tabela 3</b>	Sistema de Enneking para Estadiamento de Osteossarcomas	<b>23</b>
<b>Tabela 4</b>	Score de superexpressão doHER2 usando o Kit Herceptest DAKO	<b>54</b>
<b>Tabela 5</b>	Descrição do anticorpo primário utilizado, clones, título de diluição e fabricantes.	<b>66</b>
<b>Tabela 6</b>	Frequência das variáveis clínicas e demográficas dos 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.	<b>75</b>
<b>Tabela 7</b>	Frequência de variáveis anatomopatológicas do tumor primário dos 97 pacientes portadores de osteossarcomas de extremidades.	<b>76</b>
<b>Tabela 8</b>	Tipo de cirurgia por período em 91 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.	<b>77</b>
<b>Tabela 9</b>	Situação clínica dos 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades ao final da atualização dos dados.	<b>79</b>
<b>Tabela 10</b>	Imunorreatividade do c-erbB-2 segundo as variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.	<b>83</b>
<b>Tabela 11</b>	Imunorreatividade da Pan-caderina segundo as variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.	<b>84</b>
<b>Tabela 12</b>	Imunorreatividade do APC segundo as variáveis clínicas e demográficas e anatomopatológicas em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.	<b>85</b>
<b>Tabela 13</b>	Imunorreatividade da $\beta$ -catenina segundo as variáveis clínicas e demográficas e anatomopatológicas em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.	<b>86</b>
<b>Tabela 14</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos de acordo com variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas em 83 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades livres de metástase ao diagnóstico.	<b>88</b>
<b>Tabela 15</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença (SLD) em	

	5 anos segundo variáveis relacionadas ao tratamento e imunoistoquímicas em 83 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades livres de metástase ao diagnóstico.	89
<b>Tabela 16</b>	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para sobrevida livre de doença (SLD). Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.	90
<b>Tabela 17</b>	Sobrevida livre de doença em 83 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.	90
<b>Tabela 18</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida global (SG) e em 5 anos de acordo com variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.	92
<b>Tabela 19</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida global (SG) em 5 anos de acordo com a gradação imunoistoquímica de c-erbB-2, Pan-Caderina e APC e $\beta$ -catenina em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.	93
<b>Tabela 20</b>	Probabilidade acumulada de sobrevida global em 05 anos de acordo com variáveis relacionadas ao tratamento em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades	93
<b>Tabela 21</b>	Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para sobrevida global (SG). Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.	94
<b>Tabela 22</b>	Definição de grupos de risco na interação imunorreatividade do APC com quimioterapia pós-operatória e sobrevida global em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.	95
<b>Tabela 23</b>	Sobrevida global (SG) em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.	96

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>6</b>
3.1	Conceito	7
3.2	Epidemiologia	7
3.3	Etiologia	9
3.4	Diagnóstico	16
3.5	Aspectos Anatomopatológicos	19
3.6	Alterações Genéticas e Moleculares	22
3.7	Biópsia	23
3.8	Estadiamento	23
3.9	Fatores Prognósticos	25
3.10	Fatores Moleculares	31
3.11	Tratamento	32
3.12	Mecanismos de Invasão e Metástases	40
3.13	Métodos Imunoistoquímicos	41
3.13.1	Caderinas	42
3.13.2	Gene APC / $\beta$ -catenina	47
3.13.3	c-erbB-2	51
<b>4</b>	<b>PACIENTES E MÉTODOS</b>	<b>56</b>
4.1	Amostra do Estudo	57
4.1.1	Critérios de inclusão	57
4.1.2	Critérios de exclusão	57
4.2	Metodologia	58
4.2.1	Diagnóstico	59
4.2.2	Estadiamento	59
4.2.3	Procedimento cirúrgico	60
4.2.4	Quimioterapia	60
4.2.5	Seguimento dos Pacientes	61

4.2.6	Exame anatomopatológicos do tumor primário	62
4.2.7	Técnica de imunoistoquímica	65
4.3	Análise Estatística	71
4.4	Casuística	73
4.4.1	Aspectos demográficos e clínicos	73
4.4.2	Aspectos anatomopatológicos	75
4.4.3	Aspectos cirúrgicos	76
4.5	Tipos de Quimioterapia	77
4.6	Seguimento	78
<b>5</b>	<b>ANÁLISE DE RISCO E ASPECTOS ÉTICOS</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>82</b>
6.1	Reações Imunoistoquímicas	83
6.1.1	Imunoistoquímica do c-erbB-2	83
6.1.2	Imunoistoquímica da E-caderina	84
6.1.3	Imunoistoquímica da Pan-caderina	84
6.1.4	Imunoistoquímica do APC.	85
6.1.5	Imunoistoquímica da $\beta$ -catenina.	86
6.2	Análise de Sobrevida	87
6.2.1	Sobrevida Livre de Doença (SLD)	87
6.2.1.1	Análise Univariada	87
6.2.1.2	Análise multivariada	89
6.3	Sobrevida Global (SG)	90
6.3.1	Análise univariada	90
6.3.2	Análise multivariada	94
6.4	Interação de Imunorreatividade do APC com quimioterapia pós-operatória	94
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>97</b>
7.1	Aspectos Gerais	98
7.2	Dados Imunoistoquímicos	103
7.3	Análise de Sobrevida	108
7.3.1	Sobrevida Livre de doença	108
7.3.2	Sobrevida Global	109

<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>113</b>

**ANEXOS**

**Anexo 1**

**Anexo 2**



## ***INTRODUÇÃO***

---

# 1 INTRODUÇÃO

Osteossarcoma é o tumor ósseo primário maligno mais freqüente na criança, adolescente e no adulto jovem cujo pico de incidência ocorre na segunda década de vida correspondendo a 5% das neoplasias malignas nas crianças e adolescentes (RECH et al. 2004). A história natural deste tumor mudou a partir da década de 70. Antes de 1970 o tratamento para esta neoplasia consistia exclusivamente na cirurgia do tumor primário principalmente a amputação do membro afetado sendo a cirurgia conservadora restrita a pacientes com crescimento tumoral linear ou com pequeno envolvimento de partes moles (HOLLAND et al. 1997; TANAKA et al. 1997). Cerca de 80 a 90% dos pacientes evoluíam com doença metastática geralmente pulmonar em média em 05 meses (MEYERS et al. 1992; PENNA et al. 1993). Após 1970, com o advento da quimioterapia adjuvante e neoadjuvante, houve um aumento nas taxas de cura de 10 a 15% para 60 a 70%, melhor qualidade de vida, cirurgias menos mutiladoras e preservação funcional dos membros (HOLLAND et al. 1997). Porém o prognóstico de pacientes com doença metastática ao diagnóstico manteve-se pobre com taxa de cura de 10 a 15% (BACCI et al. 2001a). Desde esta época vários estudos clínicos têm objetivado identificar fatores prognósticos que potencialmente influenciem na sobrevida. A variação de metodologia utilizada nesses estudos leva a grande dificuldade de determinar o verdadeiro efeito prognóstico das variáveis. Dos fatores clínicos, o tamanho tumoral e necrose tumoral parecem ser preditivos de sobrevida livre de doença por análise univariada e só a necrose é significativa em modelos multivariados (DAVIS et al. 1994).

A etiologia do osteossarcoma permanece obscura, apesar dos esforços para seu esclarecimento. Alterações do gene *Rb* e, mais recentemente, erros na estrutura gênica de *p-53* e *p-16*, a expressão de glicoproteína *p* associada ao gene de resistência de múltiplas drogas-1 (MDR1) e c-erbB-2 (fator-2 de crescimento epidérmico humano), são algumas

alterações implicadas na fisiopatogênese tumoral, além da teoria das injúrias crônicas associada a pacientes com doença de Paget e submetidos à radioterapia prévia.

Com o uso de protocolos atuais para tratamento de osteossarcomas, cirurgia e quimioterapia, os pacientes sem doença metastática ao diagnóstico apresentam sobrevida livre de doença em cinco anos de aproximadamente 70%. Contudo os pacientes que recaem raramente respondem ao tratamento conservador (MACEDO e PETRILLI 1999). No momento um dos fatores preditivos mais importantes para sobrevida é a presença ou ausência de metástase ao diagnóstico. Aproximadamente 15 a 20% dos pacientes têm doença metastática ao diagnóstico, e prognóstico desfavorável (10% de sobrevida livre de doença em longo prazo) (GORLICK et al. 1999).

Os fatores anatomopatológicos tradicionais e clínicos são em geral insuficientes para prever evolução e resposta terapêutica tumoral. A proposta deste estudo é correlacionar fatores biomoleculares com clínicos, identificar fatores prognósticos, auxiliar na seleção de pacientes de risco para recorrência tumoral e sobrevida e poder proporcionar no futuro uma terapêutica mais efetiva e com menor toxicidade.

## ***OBJETIVOS***

---

## 2 OBJETIVOS

1. Analisar a associação entre c-erbB-2, Pan-Caderina, E-caderina,  $\beta$ -Catenina e APC, com os fatores clínicos, demográficos, anatomopatológicos e relacionados ao tratamento em pacientes portadores de osteossarcoma de extremidade convencionais.
2. Identificar os fatores prognósticos e padrão de imunorreatividade dos marcadores imunoistoquímicos c-erb-B-2, Pan-Caderina,  $\beta$ -Catenina e APC associados à sobrevida livre de doença e sobrevida global.
3. Com base nas variáveis de valor prognóstico identificar grupos de risco para óbito por câncer.

# *REVISÃO DA LITERATURA*

---

## **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1 CONCEITO**

Nos primeiros relatos de literatura os autores utilizavam o termo sarcoma osteogênico como uma designação coletiva para diferentes tumores ósseos primários malignos. Atualmente o termo sarcoma osteogênico é utilizado para designar tumores malignos primários dos ossos que histopatologicamente se caracterizam pela produção de matriz osteóide pelas células ósseas malignas (BROSTROM 1980). Também pode ser definido como tumor mesenquimal maligno em que as células neoplásicas são capazes de produzir matriz óssea (ROSEMBERG 2005).

### **3.2 EPIDEMIOLOGIA**

#### **3.2.1 Incidência**

Tumores primários do sistema esqueléticos são raros, correspondem a 0,2% de todos os cânceres. Para o ano de 2004 a estimativa é de aproximadamente 2440 casos novos, com 1300 óbitos nos EUA (JEMAL et al. 2004). Osteossarcoma e Sarcoma de Ewing são os dois tumores ósseos mais comuns (BRENNAN et al. 2001).

#### **3.2.2 Idade, Sexo e Raça**

Pode acometer todos os grupos etários mas, geralmente tem distribuição bimodal, 75% ocorre em pacientes mais jovens que 20 anos e em um pequeno número em idosos. Neste grupo há frequentemente condições relacionadas ao desenvolvimento do osteossarcoma como Doença de Paget, infartos ósseos ou radioterapia prévia.

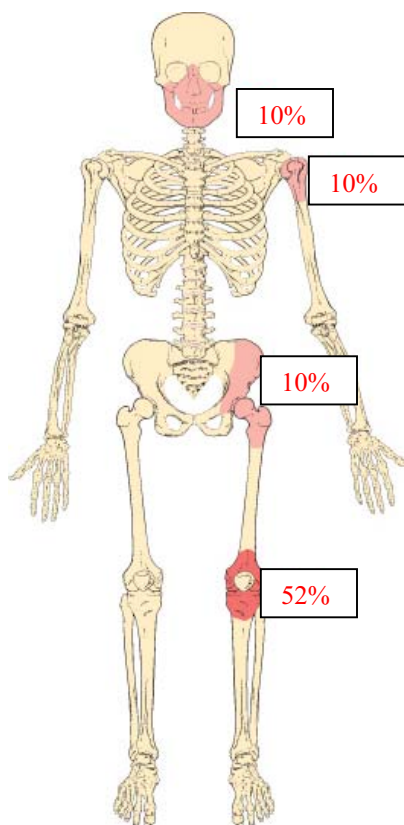
Geralmente os homens são mais comumente afetados que as mulheres (1,6:1) (TANAKA et al. 1997; ROSEMBERG 2005). A predileção pelo sexo masculino é atribuída ao seu período mais longo de crescimento esquelético, comparado com o feminino. As meninas por outro lado quando acometidas parecem ter uma tendência a faixas etárias mais baixas pois o crescimento ósseo é mais acelerado e precoce, mas a distribuição de incidência e frequência relacionada a idade do programa de “Resultados Finais, Epidemiologia, Sobrevida” (SEER) do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos não confirmou esta tendência (PRICE 1958; CZERNIAK 1998). Não há maiores diferenças entre raças (branca versus negra), mas parece que o pico de incidência durante a segunda década de vida é maior em homens brancos que em homens de outras raças (CZERNIAK 1998).

### **3.2.3 Sítio Anatômico**

Os osteossarcomas mais frequentemente aparecem na região proximal da articulação do joelho (35% no fêmur distal, 17% na tíbia proximal) e em cerca de 10% dos casos no úmero proximal. Essas lesões são geralmente metafisárias (90%), contudo podem se iniciar na diáfise (9%) e epífise (1%) (MIRRA et al. 1989; MEYER e MACKENZIE 2004) (Figura 1).

É raro no antebraço e em ossos pequenos das mãos e pés. Em indivíduos com mais de 50 anos, só 15% dos tumores ocorrem na área dos joelhos, nesta faixa etária os ossos chatos e o esqueleto axial são mais frequentemente afetados (40% dos casos). Aproximadamente 10% dos osteossarcomas ocorrem na pelvis e no íliaco, sendo o osso chato mais frequentemente envolvido. Menos de 10% dos osteossarcomas acometem osso da mandíbula e outros ossos da face (CZERNIAK 1998) sendo os osteossarcomas de mandíbula geralmente de comportamento agressivo (MARDINGER et al. 2001).





---

**Fonte:** Modificado de ROSEMBERG (2005).

**Figura 1** - Sítios anatômicos mais frequentes de osteossarcoma. Os números são de percentuais aproximados.

### 3.3 ETIOLOGIA

A patogênese e etiologia desta doença permanecem obscuras. Atualmente tem se focado aspectos gerais da carcinogênese, para esclarecer a ação de fatores de risco já conhecidos, e para proporcionar melhor entendimento de fatores moleculares.

Dentre alguns agentes etiológicos conhecidos ou fatores iniciadores estão agentes químicos, virais, radiação e outros diversos.

### **Químicos**

Vários agentes químicos podem induzir osteossarcoma como o metilcolantreno, óxido de berílio e o silicato de berílio zinco que segundo PETERSON et al. (1964) em estudo em coelhos este atua como iniciador ou gatilho para alterações genéticas.

### **Radiação**

É conhecido que pacientes expostos a radiação para tratamento de uma doença podem desenvolver osteossarcoma no campo de radiação. A administração de radioterapia concomitante a quimioterapia com antracíclico significativamente reduz o intervalo para o desenvolvimento do tumor. A radiação pode causar osteossarcoma independente da fonte, porém a dose mínima não é bem estabelecida. O período mínimo entre a exposição a radiação e o desenvolvimento de câncer na prática é de pelo menos 04 anos em humanos (PRITCHARD et al. 1975). Estes tumores geralmente são agressivos e de curta sobrevida (CZERNIAK 1998).

De acordo com a localização os osteossarcomas secundários a radiação apresentam a seguinte distribuição respectivamente em relação aos osteossarcomas primários: ossos pélvicos (8,6% x 25,2%), crânio (7,8% x 19,6%) e costelas (2,4% x 11,2%) (HAMRE et al. 1999).

### **Viral**

Os primeiros estudos que relacionam vírus e câncer se iniciaram em 1911 quando ROUS et al. (1912) injetaram extrato de células de galinha com fibrossarcoma em outras galinhas e estas desenvolveram sarcomas. Este fato provou que o RNA genômico do vírus

foi transcrito a DNA o qual se incorporou ao genoma da célula hospedeira. Dentre os vírus conhecidos que podem estar relacionados a tumores ósseos incluem vírus políoma e Simian Vírus-40.

### **Fatores Hereditários**

Entre as síndromes hereditárias relacionadas com o desenvolvimento de osteossarcoma estão: Síndrome de Rothmund-Thompson ou Poiquiloderma congênito, síndrome de Bloom e a Síndrome de Li Fraumeni (FUCHS e PRITCHARD 2002).

### **Osteossarcoma Familiar**

Identificam-se duas formas de apresentação; esporádica, em gêmeos sem padrão de transmissão e a forma mais comum de transmissão familiar na quais várias gerações da família são frequentemente afetadas por retinoblastoma. Essa associação peculiar entre dois tumores aparentemente não relacionados parece estar ligada a um mesmo mecanismo genético molecular.

### **Associação de Retinoblastoma e Osteossarcoma**

A mutação do gene Rb na linhagem germinativa predispõe ao desenvolvimento de osteossarcoma cujo risco aumenta em 100 vezes em relação à população normal e também aumenta o risco de osteossarcoma induzido por radioterapia e outras neoplasias. Deleções em ambos os alelos do locus Rb do cromossomo 13-14 são necessárias. A perda da função remove o controle regulatório deste gene e sua capacidade supressora de tumor (CZERNIAK 1998; FUCHS e PRITCHARD 2002).

### **Osteossarcoma Multifocal**

Pode ser sincrônico que ocorre mais frequentemente em crianças e adolescentes e metacrônico em adultos. O tipo sincrônico é geralmente de alto grau, esclerosante, intramedular, principalmente de ossos longos, de distribuição simétrica e geralmente letal (sobrevida de 6 a 8 meses). Se a apresentação não tem massa dominante ou metástase pulmonar ao diagnóstico certamente representa o desenvolvimento de mais de um tumor primário. Já o metacrônico acomete geralmente tronco, é menos agressivo e associado a uma sobrevida mais longa; e ao contrário do tipo sincrônico é difícil excluir a possibilidade que o desenvolvimento de tumores sequenciais representam metástases ósseas (CZERNIAK 1998).

### **Etiologia Molecular**

Os resultados de vários estudos sugerem que alterações em vários genes regulatórios do ciclo celular estão envolvidas na patogênese de osteossarcoma (BRAMWELL 2000). Estes estudos têm valor limitado para o diagnóstico, prognóstico e no entendimento molecular. Problemas técnicos como avaliação do tumor após a quimioterapia, descalcificação e a raridade do próprio tumor dificultam os progressos nesta área (RAGLAND et al. 2002).

De acordo com HANAHAN e WEINBERG (2000) a manifestação clínica do câncer é baseada em seis alterações essenciais na fisiologia celular:

#### **1 Auto-suficiência no sinal de crescimento:**

As células normais necessitam de sinais de crescimento para a transição da fase queiscente para fase proliferativa. Esses sinais originam-se de fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e outras moléculas importantes na interação célula-

célula. São mediados via receptores de membrana em células normais, diferente das células tumorais que proliferam-se independente de estímulo. As células tumorais são capazes de sintetizar fatores de crescimento que atuam sobre estas próprias células (FEDI et al. 1997). A autonomia dos sinalizadores de crescimento se origina de componentes citoplasmáticos, os quais integram os sinais emitidos por receptores de fatores de crescimento (HUNTER 1997). O receptor de fator de crescimento epidérmico-2 (ou erbB-2), (LETSON e MURO-CACHO 2001; FUCHS e PRITCHARD 2002) o c-fos (fator de transcrição envolvido na mediação de sinais de crescimento) (POMPETTI et al. 1996) estão envolvidos neste processo.

## **2 Insensibilidade a sinais de inibição de crescimento:**

Basicamente os sinais de inibição de crescimento podem bloquear a proliferação tanto mantendo a célula na fase G<sub>0</sub> ou por bloqueio direto da proliferação. Todos os sinais antiproliferativos convergem para a proteína (*pRb*) a qual bloqueia a proliferação pela alteração de fatores de transcrição responsáveis pela passagem da fase G<sub>1</sub> para fase S (WEINBERG 1995).

## **3 Morte celular programada (apoptose):**

Este programa normalmente esta presente de forma latente em toda célula do corpo, já a célula tumoral tem a capacidade de escapar deste programa de morte celular programada. Em osteossarcoma estão envolvidos neste processo os efetores que incluem receptores de superfície celular que regulam fatores de vida ou morte como IGF1, IGF2, e TNF-alfa e TNF-R1, respectivamente (ASHKENAZI e DIXIT 1999; BUTT et al. 1999). O *gene p53* que quando mutado pode induzir a resistência a apoptose. O produto do gene MDR-1(resistência a múltiplas drogas), a *glicoproteína-p* é responsável pelo efluxo de vários

agentes citotóxicos da célula (drogas quimioterápicas) também participa desta etapa (CHAN et al. 1997; WUNDER et al. 2000). E o oncogene MDM2 se liga a proteína produto do gene supressor p53 e serve como regulador negativo do p53 (LADANYI et al. 1993).

#### **4 Perda do limite de replicação:**

Toda célula apresenta um programa intrínseco que limita a sua capacidade de replicação, a célula tumoral rompe o padrão e adquire um potencial replicativo ilimitado associado a função da telomerase (BRYAN e CECH 1941; BRYAN e SHIMKIN 1941; SHAY e BECHETTI 1996). Em osteossarcomas há raros relatos e estes são contraditórios (AUE et al. 1998; SCHEEL et al. 2001).

#### **5 Angiogênese Sutentada:**

As células tumorais tem a capacidade de promover a angiogênese. Atuam com estimuladores, VEGF e FGF1 e FGF2 (VEIKKOLA e ALITALO 1999) e como inibidor a trombospondin-1 (HANAHAN e FOLKMAN 1996). A expressão de mRNA de VEGF em osteossarcoma tem sido associada a pior prognóstico (LEE et al. 1999; KAYA et al. 2000).

#### **6 Invasão tecidual e metástase:**

As células tumorais apresentam a capacidade de invasão e metástase. Participam deste processo moléculas de adesão celular como as caderinas e integrinas que se unem as células da matriz extracelular (VARNER e CHERESH 1996; KASHIMA et al. 1999) e também as proteases extracelulares (CHAMBERS e MATRISIAN 1997). Além da

glicoproteína CD44, outra molécula de adesão relacionada em osteossarcoma a potencial metastático e a menor sobrevida (KURYU et al. 1999; KIM et al. 2002).

### **Outras Causas:**

Trauma é um fator duvidoso, não se sabe se é um fator causal ou coincidente com a neoplasia. Associação com queimadura elétrica, uso de filme plástico subperiósteo, é um fator pouco elucidativo, talvez a anoxia induza a dano do DNA semelhante à radiação.

A relação entre Doença de Paget e osteossarcoma apesar de não ser bem entendida, corresponde a mais comum precursora condição não neoplásica associada ao desenvolvimento de osteossarcoma (CZERNIAK 1998). Cerca de 1% dos pacientes com Doença de Paget desenvolverão osteossarcoma e apresentam 200 vezes maior o risco que a população geral e recentemente demonstrou-se uma predisposição genética. Paget e osteossarcoma esporádico apresentam perda de heterozigosidade de toda ou parte da porção distal do cromossomo 18 (HANSEN et al. 1999; McNAIN et al. 2001). Os osteossarcomas precedidos de doença de Paget geralmente são de alto grau e os sítios mais acometidos são pélvis, úmero e fêmur respectivamente (CZERNIAK 1998).

Infartos ósseos são raramente relacionados como fator etiológico dos sarcomas e a maioria são histiocitoma fibroso ou fibrossarcoma, porém osteossarcomas de alto grau também tem sido reportados (HEATER e COLLINS 1987; CZERNIAK 1998).

Displasia Fibrosa é associada a osteossarcoma em cerca de 0,4% dos casos e a maioria destes pacientes tem história de radioterapia prévia. Acometem geralmente pacientes na terceira ou quarta década e os osteossarcomas de alto grau são os mais freqüentes (CZERNIAK 1998).

Osteomielite crônica também tem sido relatado como fator predisponente a osteossacoma, apesar de raro e o tipo histológico geralmente é o fibroblástico (GIUNTI e LAUS 1978; JOHNSTON e MILES 1973; CZERNIAK 1998).

### **3.4 DIAGNÓSTICO**

#### **Sintomas e sinais clínicos**

O mais comum é a dor, sendo esta geralmente contínua por semanas ou meses e pode ser severa relacionada à penetração na cortical óssea e irritação do periósteo ou, mesmo por fratura patológica (CZERNIAK 1998). Ao exame locorregional pode ocorrer limitação funcional principalmente da articulação adjacente, flacidez ou atrofia muscular, associado à presença de massa tumoral, edema e deformidade (WITTIG et al. 2002). Sintomas constitucionais como perda ponderal são geralmente associados à doença disseminada, a qual é mais freqüente na forma de metástases pulmonares (CZERNIAK 1998). Metástases linfonodais são raras, e quando há aumento dos linfonodos regionais deve ser feita exclusão de processo inflamatório tipo osteomielite (WITTIG et al. 2002).

#### **Achados radiológicos**

##### **Raio X simples**

No osteossarcoma os achados radiológicos são variáveis. A maioria dos osteossarcomas apresenta um padrão de crescimento destrutivo, o processo pode ser limitado ao espaço medular, mas na maioria das vezes o córtex está envolvido e destruído pelo menos focalmente (CZERNIAK 1998). A maioria dos osteossarcomas convencionais são de alto



grau, intramedular, grandes, geralmente com mais de cinco centímetros, com alteração da densidade óssea, reação periosteal e massa de partes moles, este padrão corresponde a 75% dos osteossarcomas. O crescimento do tumor na superfície óssea pode elevar o periósteo e induzir a reação periosteal na forma de um triângulo aberto sobre o lado da diáfise da lesão conhecida como triângulo de Codman. Algumas vezes a reação periosteal pode se apresentar na forma de múltiplas camadas (casca de cebola), a qual é mais tipicamente vista em tumores de pequenas células como sarcoma de Ewing ou osteossarcoma diafisários (CZERNIAK 1998; MEYER e MACKENZIE 2004). O componente de partes moles pode demonstrar ossificação e ser detectado ao Raio X. Fraturas patológicas também podem estar presentes.

A radiografia pode ser usada no diagnóstico diferencial de massa óssea onde se incluem: osteossarcoma, sarcoma de Ewing, osteomielite, osteoblastoma, tumor de células gigantes, cisto ósseo aneurismático, displasia fibrosa. Também para avaliação de metástases pulmonares, porém a tomografia computadorizada é mais sensível para esta finalidade (WITTIG et al. 2002).

#### **A tomografia computadorizada:**

Pode ser usada para detecção de metástases pulmonares e avaliação local da extremidade afetada para avaliar a extensão intraóssea ou extraóssea. A tomografia pode ser superior a ressonância nuclear magnética para determinar a extensão do envolvimento de partes moles, de estruturas vasculares (WITTIG et al. 2002) e nos casos de tumores de localização mais difícil como pelvis, sacro e vértebra (HOSALKAR e DORMANS 2004). Os pacientes com osteossarcoma não metastáticos também devem ser submetidos à tomografia no seguimento pós tratamento (WITTIG et al. 2002).

Em osteossarcoma o diagnóstico de doença metastática através da presença de nódulos pulmonares com calcificação e pneumotórax são frequentes. O pneumotórax

geralmente é espontâneo ocorre em 5 a 7% e muitas vezes esta relacionada à metástase pulmonar oculta (SEO et al. 2001).

#### **A ressonância nuclear magnética:**

Importante para determinar o melhor local para biópsia diagnóstica, os critérios de ressecabilidade e a proposta terapêutica (amputação x cirurgia conservadora com margens adequadas). Avalia a extensão do tumor no osso e para a articulação adjacente, além da relação com seu componente de partes moles, feixe vâsculo-nervoso e musculatura adjacente. A presença de “skip metástases” por ser detectada pela ressonância nuclear magnética pelo achado de lesões no mesmo osso afetado e na articulação adjacente (metástases em salto intraarticular) (MEYER e MACKENZIE 2004).

#### **A cintilografia óssea de corpo inteiro:**

Útil para determinar sítios de doença metastática, envolvimento polioestótico, extensão intraósseo, lesões sincrônicas e “skip metástases”. Também pode ser utilizada para avaliação de resposta do tumor e detecção de recorrência. A cintilografia com tálio e o (FDG-PET) tomografia com emissão de positron usando 2-[F-18]-fluor-2-deoxi-d-glicose também podem ser utilizadas nesta mesma finalidade (NADEL e STILWELL 2001). Na detecção de “skip metástases” a ressonância nuclear magnética parece ser superior (WITTIG et al. 2002).

**Angiografia:**

É um procedimento invasivo que pode ajudar no planejamento cirúrgico e na avaliação de resposta a quimioterapia neoadjuvante. O osteossarcoma apresenta neovascularização que corresponde à área de tumor viável que tende a desaparecer quanto melhor for a resposta a quimioterapia (WITTIG et al. 2002).

**3.5 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS**

O diagnóstico histológico de osteossarcoma é difícil, pois o tecido ósseo contém diferentes tipos de células e em vários estágios de maturação. O osso é constituído por tecido cartilaginoso, osteóide, fibroso e elementos da medula óssea e cada tecido pode se transformar em células tumorais benignas ou malignas, dificultando a diferenciação de osteossarcoma, condrossarcoma, fibrossarcoma e algumas vezes de patologias benignas como cisto ósseo aneurismático, displasia fibrosa ou osteomielite crônica (CZERNIAK 1998).

Os tumores ósseos são classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (RAYMOND et al. 2002) conforme o tipo celular predominante e produtos de proliferação celular em:

**Tabela 1** - Classificação de osteossarcoma de acordo com a OMS (2002).

- 
- 1-Osteossarcoma convencional
    - Osteoblástico
    - Condrolástico
    - Fibroblástico
  - 2-Osteossarcoma Telangiectásico
  - 3- Osteossarcoma de células pequenas
  - 4- Osteossarcoma central de baixo grau
  - 5- Osteossarcoma parosteal
  - 6- Osteossarcoma periosteal
  - 7-Osteossarcoma de alto grau de superfície
  - 8- Osteossarcoma secundário
- 

Fonte: RAYMOND et al. 2002

### **Osteossarcoma convencional**

Também conhecido como osteossarcoma clássico, central ou sarcoma osteogênico. É caracterizado macroscopicamente por tumores grandes geralmente com mais de 05 cm, localizado na metáfise que pode apresentar consistência mole ou endurecida. Tendem a invadir a córtex associado a componente de partes moles. Podem ter aspecto acinzentado e granular (similar à pedra-pomes), enquanto outros tornam-se densos, escleróticos e de coloração amarela-esbranquiçada.

Histopatologicamente apresentam-se como tumor de células fusiformes. Na citologia tendem a ser anaplásicos, pleomórficos nas quais as células tumorais podem ter padrão: epitelióide, plasmocitóide, fusiforme, ovóide, pequenas células redondas, de células claras, de células mono ou multinucleada. A maioria dos casos apresenta uma complexa mistura de dois ou mais destes tipos celulares.

Os osteossarcomas convencionais podem produzir uma quantidade variada de cartilagem e tecido fibroso e assim são subdivididos conforme a matriz predominante em: osteoblástico (50%), condroblástico (25%) e fibroblástico (25%)

A imunohistoquímica e microscopia eletrônica são pouco utilizadas, mas podem ajudar para exclusão de outros diagnósticos como, carcinoma sarcomatóide ou sarcoma sinovial. O osteossarcoma 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.

**Tabela 2** - Tipos histológicos de osteossarcoma não convencionais, definição e sinonímia, segundo OMS.

<b>Tipo Histológico</b>	<b>Definição</b>	<b>Sinonímia</b>
<b>Osteossarcoma Telangiectásico</b>	Ocupa grandes espaços com sangue, com ou sem septos.	Aneurisma ósseo maligno, Osteossarcoma hemorrágico, Osteossarcoma cisto ósseo aneurismático like.
<b>Osteossarcoma de Pequenas células</b>	Composto de pequenas células com vários graus de produção osteóide.	
<b>Osteossarcoma central de baixo grau</b>	Inicia na medular do osso	Osteossarcoma intramedular bem diferenciado, Osteossarcoma intramedular de baixo grau ou Osteossarcoma intraósseo de baixo grau.
<b>Osteossarcoma Secundário</b>	Sarcomas formadores de osso que ocorrem em ossos afetados por anormalidades prévias. Ex: Doença de Paget e alterações da radiação.	
<b>Osteossarcoma Parosteal</b>	Tumor de baixo grau que se inicia na superfície do osso	Osteossarcoma justacortical ou Osteossarcoma justacortical de baixo grau.
<b>Osteossarcoma Periosteal</b>	Osteossarcoma condroblástico de grau intermediário que se inicia na superfície do osso	Condrosarcoma justacortical ou Osteossarcoma condroblástico justacortical
<b>Osteossarcoma de superfície de alto grau</b>	Formador de osso de alto grau que se inicia na superfície do osso.	Osteossarcoma justacortical ou Osteossarcoma de superfície

Fonte: RAYMOND et al. 2002

### 3.6 ALTERAÇÕES GENÉTICAS E MOLECULARES

Os cariótipos de osteossarcoma são geralmente complexos com várias alterações numéricas e estruturais (LETSON e MURO-CACHO 2001; RAYMOND et al. 2002) particularmente em tumores de alto grau. Múltiplos clones são comuns e podem estar relacionados entre si ou não (RAYMOND et al. 2002). As mais freqüentes perdas de heterigozidade têm sido reportadas nos cromossomos *3q*, *13q*, *17p* e *18q* (RAYMOND et al. 2002). Já as aberrações mais frequentemente detectadas pela hibridização genômica comparativa são o aumento do número de cópias de *1q21* e *8q (8q21.3-q22)* e *8cen-q13*, seguido por número de cópias aumentado de *14q24-qter* e *Xp11.2-p21*. As mais comuns perdas ocorrem no *6q16* e *6q21-22*, (RAGLAND et al. 2002), porém outras perdas da sequência de DNA também foram relatadas em *2q*, *8p* e *10p* (RAGLAND et al. 2002). O aumento do número de cópias de *8q21.3-q22*, *1q21* e *8cen-q13* tem sido relacionado a menor sobrevida livre de doença a distância e a sobrevida global mais curta, sendo o ganho de *8q23* observado em 50% dos tumores (LETSON e MURO-CACHO 2001; RAGLAND et al. 2002).

A amplificação genômica especialmente da ligação do gene *p53* ao MDM2 e do gene SAS tem importante papel na biologia destes tumores. A superexpressão do MET e FOS tem sido reportada em mais de 50% dos casos de osteossarcoma e o MYC superexpresso em menos de 15% dos casos. MYC, FOS e catepsina L superexpressos são detectados em alta proporção de tumores recidivados e metastáticos (RAYMOND et al. 2002). A prevalência destas alterações em conjunto com a inativação do *RB* ocorre em mais de 80% dos casos, sugerindo que lesões genéticas que alteram a regulação do ciclo celular na fase  $G1 \rightarrow S$  são uma constante na patogênese do osteossarcoma (LETSON e MURO-CACHO 2001).

### 3.7 BIÓPSIA

Tem papel importante, oferecendo uma quantidade de tecido adequado para diagnóstico histopatológico, imunoistoquímico e para testes genéticos. Biópsia inadequada pode estar associada freqüentemente a erros diagnósticos, amputação, recorrência local e podem ter um efeito negativo sobre a sobrevida (LOPES et al. 1993; STADDON et al. 2002). A biópsia pode ser aberta ou por agulha. A biópsia aberta deve ser bem planejada para não interferir no tratamento subsequente. As biópsias percutâneas por agulha são possíveis e tem a vantagem de pouca ou nenhuma anestesia, serem minimamente invasivas, sem incisão e consideradas de baixo risco de infecção, contaminação e fratura pós-biópsia. A biópsia por agulha é apropriada em localizações como coluna e acetábulo (STADDON et al. 2002).

### 3.8 ESTADIAMENTO

O mais comum sistema de estadiamento cirúrgico é o sistema de Enneking (ENNEKING et al. 1980) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Sistema de Enneking para Estadiamento de Osteossarcomas.

<b>Sistema de Enneking para Estadiamento de Osteossarcomas</b>	
<b>Estádio</b>	<b>Grau e Extensão anatômica</b>
I	Tumor de baixo grau tumoral
IA	Intracompartimental
IB	Extracompartimental
II	Tumor de alto grau tumoral
IIA	Intracompartimental
IIB	Extracompartimental
III	Qualquer grau com metástases

**Fonte:** ENNEKING et al. (1980).

Outro sistema de estadiamento que pode ser utilizado, o TNM - 2002 (American Joint Committee on Cancer) (Figura 2).

### Estadiamento TNM (Classificação Clínica) / 2002

#### T- Tumor primário

Tx tumor primário não pode ser medido  
 T0 Sem evidência de tumor primário  
 T1 tumor com 08 cm ou menos no maior diâmetro  
 T2 tumor com mais de 08cm no maior diâmetro  
 T3 descontinuação do tumor do sítio 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

#### pTNM Classificação histopatológica

pT, pN, pM são categorias correspondentes a T,N,M

#### G Grau Histopatológico

##### TNM sistema de 02 graus

Baixo grau  
 Alto grau

##### Sistema de 03 graus

grau 1  
 grau 2/3

##### Sistema de 04 graus

grau1/2  
 grau 3/4

#### Agrupamento por Estádio

Estádio IA	T1	N0,NX	M0	baixo grau
Estádio IB	T2	N0,NX	M0	baixo grau
Estádio IIA	T1	N0,NX	M0	alto grau
Estádio IIB	T2	N0,NX	M0	alto grau
Estádio III	T3	N0,NX	M0	qualquer grau
Estádio IVA	Qualquer T	N0,NX	M1a	qualquer grau
Estádio IVB	Qualquer T	N1	Qualquer M	qualquer grau
	Qualquer T	Qualquer N	M1b	qualquer grau

# Esta classificação se aplica a todos os tumores malignos primários ósseos exceto linfomas malignos, mieloma múltiplo, osteossarcoma superficial/ justacortical e condrossarcoma justacortical (SOBIN e WITTEKING, 2002).

# Devido a raridade de envolvimento linfonodal em sarcomas, a designação NX não deve ser apropriada e pode ser considerado N0 se nenhum envolvimento clínico é evidente (GREENE, 2002).

Fonte: SOBIN e WITTEKING (2002); GREENE et al. (2002)

**Figura 2** - Estadiamento TNM (Classificação Clínica) / 2002



### **3.9 FATORES PROGNÓSTICOS**

#### **Doença metastática ao diagnóstico**

A presença de doença metastática ao diagnóstico é relatada como um dos piores fatores prognósticos em análise univariada e multivariada, com menos de 20% dos pacientes com sobrevida livre de doença em 05 anos. Estes resultados desfavoráveis são devidos geralmente a tumores de grande volume com menor possibilidade de ressecção total, do que devido à refratariedade a quimioterapia (BIELACK et al. 2002; RECH et al. 2004). Neste grupo o intervalo entre o início dos sintomas e diagnóstico geralmente é curto, traduzindo um comportamento tumoral mais agressivo (BACCI et al. 2002; RECH et al. 2004). Pacientes com doença metastática pulmonar tendem a ter melhor resposta ao tratamento que pacientes com doença metastática óssea ou em medula óssea cujo prognóstico é bastante reservado (BIELACK et al. 2002; RECH et al. 2004).

#### **Tamanho Tumoral**

O tamanho tumoral é um fator prognóstico importante e facilmente obtido em pacientes com osteossarcoma, podendo servir como base para terapia baseada no risco. Uma das melhores formas de mensuração deste é através da medida absoluta das três dimensões. A incidência de metástases está relacionada ao aumento do tamanho do tumor principalmente com volumes tumorais absolutos (ATV) acima de  $150\text{cm}^3$  (BIELING et al. 1996). Tumores volumosos e com pobre resposta a quimioterapia representam tumores de alto risco, com uma probabilidade de sobrevida livre de metástases de 25%, apesar de quimioterapia intensiva (BIELING et al. 1996). PETRILLI et al. (1991a) relataram a importância prognóstica do tamanho tumoral em relação a sobrevida, onde pacientes com

tumores maiores ou iguais a 15 cm apresentaram menor sobrevida na análise uni e multivariada e os autores sugerem que estes devem ser tratados com terapêutica mais agressiva.

### **Margens Tumorais**

Em pacientes tratados no Instituto Rizolli entre 1983 e 1995, a análise multivariada revelou duas variáveis independentemente relacionadas, margens cirúrgicas e recorrência local. Foi observado por este grupo 3,1% de recorrência local em pacientes com margens cirúrgicas adequadas e 23,8% para margens inadequadas (marginal, intralesional ou contaminada). Da mesma forma, com relação a resposta a quimioterapia pré-operatória a incidência de recorrência local foi de 4% em bons respondedores (necrose > 90%) e 8% em pobre respondedores (necrose < 90%). Assim na presença de margens adequadas e boa resposta a quimioterapia, o risco de recorrência local foi menor que 3% e aumentou para 40% em pacientes com margens inadequadas e pobre respondedores. A recorrência local em pacientes com osteossarcoma de extremidade é associada a prognóstico extremamente reservado e a recaída sistêmica (BACCI et al. 1998b). Dessa forma pacientes submetidos a cirurgias conservadoras com margens cirúrgicas inadequadas devem ser submetidos a uma segunda intervenção, particularmente se associados a pobre resposta a quimioterapia (BACCI e LARI 2001).

### **Idade**

A maioria dos estudos tanto sobre diagnóstico ou tratamento de sarcoma osteogênico são desenvolvidos na faixa etária pediátrica, sendo as demais faixas etárias raramente mencionadas exceto no caso de osteossarcoma secundário a doença de Paget (risco de

osteossarcoma de 0,2%) (WICK et al. 1981) ou após a radioterapia (SIM et al. 1972). Apesar da taxa de resposta ser relatada como menor nos adultos com doença avançada, (BACCI et al. 1998a, CARSI e ROCK 2002; OKADA et al. 2004) evidenciaram melhor sobrevida a longo prazo em pacientes entre 40 e 60 anos. Conclusão similar foi encontrada pelo Grupo Cooperativo de Osteossarcoma (BIELACK et al. 2000) com taxa de sobrevida global e livre de doença de 62% e 46% respectivamente, sendo este grupo defensor da similaridade de prognóstico nos adultos quando tratados com os mesmos princípios, considerando o grau de necrose tumoral o fator prognóstico mais importante na maioria das séries de osteossarcoma clássicos (GLASSER e LANE 1991; GLASSER et al. 1992; BACCI et al. 1998a).

Há uma dificuldade de entender a evolução desfavorável nos pacientes idosos porém, doença metastática a apresentação, fratura patológica, tumores volumosos, comprometimento do esqueleto axial e margens cirúrgicas inadequadas no momento da cirurgia mostram uma tendência a menor sobrevida (CARSI e ROCK 2002; OKADA et al. 2004).

Alguns estudos evidenciam piora do prognóstico com a idade entre adultos e consideram o prognóstico idade independente nas crianças (SWEETNAM et al. 1971; BENTZEN et al. 1988; DORFMAN e CZERNIAK 1995). Apesar da descrição de SPANIER et al. (1990), de melhor prognóstico em pacientes mais jovens que 10 anos, em uma amostra em que a idade variou da primeira a sétima década, na análise multivariada esta vantagem não manteve significância (DAVIS et al. 1994).

### **Sexo**

Várias séries tem implicado o sexo como fator prognóstico independente (BOSTROM 1980; GOORIN et al. 1987; RAYMOND et al. 1987; DAVIS et al. 1994). E no estudo do Scandinavian Sarcoma Group Osteosarcoma Study (SSG) II e VIII o sexo

feminino foi de prognóstico mais favorável (SAETER et al. 1999; SMELAND et al. 2003). Geralmente as pacientes do sexo feminino apresentam maior duração dos sintomas e tumores de baixo grau (BOSTROM 1980).

Segundo GOORIN et al. (1987) e RAYMOND et al. (1987) o sexo foi uma variável significativa na sobrevida livre de doença, e no estudo de PETRILLI et al. (1991b) na sobrevida global em análise univariada, porém na análise multivariada esta variável perdeu a significância (DAVIS et al. 1994).

### **Nível sérico elevado de DHL/fosfatase alcalina**

O nível sérico de DHL (desidrogenase láctica) geralmente está relacionado à extensão da doença (POCHANUGOOL et al. 1997). A elevação deste está associada a aumento do risco de recidiva e morte, e é considerado um fator prognóstico desfavorável conforme o estudo do Osteossarcoma Multi-institucional, COSS-80 e 86 (Cooperative Osteosarcoma Study Group 80-86) (WINKLER et al. 1983 e 1988; MEYERS et al. 1992; LINK e EILBERG 2002; RECH et al. 2004).

Os altos níveis de fosfatase alcalina e tumores de grandes volumes tem sido frequentemente associados a pacientes com doença metastática. Em pacientes com doença localizada esta elevação é considerada um fator de mau prognóstico (DAVIS et al. 1994). A elevação do nível de fosfatase alcalina pós operatória sugere doença persistente, recorrente ou metastática (CZERNIAK 1998).

### **Resposta à quimioterapia neoadjuvante (Grau de necrose).**

A necrose induzida pela quimioterapia é considerada um dos mais importantes fatores prognósticos em osteossarcoma (ROSEN et al. 1982; WINKLER et al. 1984;

DELEPINE et al. 1988; WINKLER et al. 1988; BACCI et al. 1990; SAETER et al. 1991; BRAMWELL et al. 1992; MEYERS et al. 1992; PROVISOE et al. 1997; FUCHS et al. 1998). Alguns fatores estão relacionados à necrose dentre eles: 1) fatores relacionados ao tumor (tipo histológico, volume, sítio antômico e fosfatase alcalina), 2) relacionados ao hospedeiro (idade e sexo) e 3) relacionados ao tratamento (como o nível sérico de metotrexate) (BACCI et al. 2001a).

O grau de necrose induzido pela quimioterapia é classificado mais frequentemente em Grau de necrose de HUVOS et al. (1977) sendo dividido em: grau I-pobre resposta ou sem efeito da quimioterapia, grau II-resposta moderada com áreas de tumor osteóide acelular, necrose, fibrose atribuído ao efeito da quimioterapia; grau III-predomínio de áreas com tumor osteóide acelular, necrose, fibrose com foco discreto de células tumorais viáveis e Grau IV-ausência de células tumorais viáveis. A maioria dos autores subdivide os pacientes em bons e maus respondedores baseado no grau de necrose  $> 90\%$  ou  $< 90\%$  (WINKLER et al. 1988; BRAMWELL et al. 1992; MEYERS et al. 1992; SOUHAMI et al. 1997), porém outros consideram de significância prognóstica em sobrevida livre de doença o grau de necrose completa versus incompleta (MEYERS et al. 1992; BACCI et al. 1993; BACCI et al. 2001a e ou b). Em vários estudos com quimioterapia neoadjuvante a sobrevida livre de doença em 05 anos foi de 80% para pacientes com necrose completa (Huvos IV), 61% para necrose entre 90 e 99% (Huvos III) e 47% para necrose menos que 90% (Huvos I eII) (BACCI et al. 1994). Já no estudo do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center a sobrevida livre de doença foi de 91%, 72% e 62% para pacientes com necrose completa, entre 90 e 99% de necrose, e menos que 90% respectivamente (MEYERS et al. 1992). A taxa de resposta completa parece ser maior em pacientes com doença localizada do que naqueles com doença metastática a apresentação. Não se sabe se por maior resposta tumoral ou por diferença biológica entre eles BACCI et al. (1998 b) encontrou uma diferença de

quimiosensibilidade entre estes dois grupos e a taxa de resposta completa foi de 21% para doença localizada e nula na doença metastática a apresentação (WINKLER et al. 1990).

### **Tipo histológico**

A taxa de resposta à quimioterapia de acordo com o tipo histológico não é um fato surpreendente, já que UNNI e DAHLIN (1979) consideram osteossarcoma uma entidade não homogênea, mas um grupo de doenças com potenciais biológicos diferentes. Conforme AYALA et al. (1984) esta entidade heterogênea apresenta um tipo histológico predominante que justifica uma subclassificação e que provavelmente indica que graus de diferenciações diferentes podem ter quimiosensibilidades diferentes (OKADA et al. 1999). Dentre os subtipos histológicos os condroblásticos são pobres respondedores, e os subtipos telangiectásicos e fibroblásticos melhores respondedores que o tipo osteoblástico e condroblástico (WINKLER et al. 1990; BACCI et al. 2001a). Este fato também é relatado por outros autores que consideram o grau de necrose maior que 90%, com taxa de resposta completa de (42,3%) em telangiectásico, (33,3%) em fibroblásticos e de 6,1% em tumores condroblásticos (BACCI et al. 1998b).

### **Nível sérico de metotrexate**

Alguns autores relacionam grau de necrose tumoral com nível sérico de metotrexate e tempo de infusão desta droga (DELEPINE et al. 1988; BACCI et al. 1998b). Níveis acima de 1000 $\mu$ mol/L não ofereceram qualquer vantagem na resposta histológica, porém valores diferentes foram relatados por BACCI et al. (1998b) e esta discrepância pode ser explicada pela duração da infusão.

### 3.10 FATORES MOLECULARES

Não necessariamente específico para osteossarcoma um número importante de genes tem sido identificado, incluindo genes supressores de tumor, oncogenes. A importância de vários destes ainda permanece obscura.

#### **Gene *RB***

A associação entre a mutação do gene *RB* e osteossarcoma é bem conhecida (KITCHIN e ELSWORTH 1974; ABRAMSON et al. 1984). A perda do heterozigossidade (LOH) do locus do gene *RB* no cromossomo 13 esta presente em quase 60 a 70% dos tumores (ARAKI et al. 1991; WUNDER et al. 1991; YAMAGUCHI et al. 1992; BELCHIS et al. 1996, FEUGEAS et al. 1996; MILLER et al. 1996) e esta tem sido proposta como fator prognóstico adverso em osteossarcoma (FEUGEAS et al. 1996; BENASSI et al. 1999).

#### **P16**

Deleções e perda da expressão de p16 são encontradas em 10 a 15% dos casos de osteossarcoma (BELCHIS et al. 2000; MAITRA et al. 2001) e correlacionadas com diminuição da sobrevida em pacientes pediátricos (MAITRA et al. 2001).

#### **c-erbB-2**

O c-erbB-2 é expresso em 40-45% dos casos de osteossarcoma (LETSON e MURO-CACHO 2001). Está relacionado a pior sobrevida livre de eventos (47% X 79% em 05 anos) em pacientes com doença não metastática, menor necrose tumoral após quimioterapia

neoadjuvante, crescimento tumoral mais agressivo e maior potencial de metástase (ONDA et al. 1996; FUCHS e PRITCHARD 2002).

### **P53**

O gene supressor de tumor p53, localizado no cromossomo 17p13, (McBRIDE et al. 1986; LADANYI e GORLICK 2000) encontra-se com anormalidades em mais de 50% dos casos de osteossarcoma (MASUDA et al. 1987; GUO et al. 1996; MILLER et al. 1996; LONARDO et al. 1997; SZTAN et al. 1997).

A expressão da proteína p53 e sua mutação têm sido associadas a pobre prognóstico e resposta a quimioterapia na maioria das neoplasias humanas. Entretanto em osteossarcoma esta correlação não foi encontrada (UEDA et al. 1993; BALDINI et al. 1995; MILLER et al. 1996; CHAN et al. 1997; YOKOYAMA et al. 1998; GORLICK et al. 1999).

### **Glicoproteína p**

Alguns estudos mostraram uma evolução desfavorável, com aumento da incidência de recidiva (SERRA et al. 1999), em pacientes com osteossarcoma e glicoproteína p positiva (BALDINI et al. 1995; SERRA et al. 1995; CHAN et al. 1997; SERRA et al. 1999).

## **3.11 TRATAMENTO**

### **Quimioterapia Adjuvante**

O tratamento quimioterápico é um marco importante na história do osteossarcoma. Antes de 1970, os pacientes portadores de osteossarcoma eram submetidos à amputação, e a sobrevida era pobre, 80% dos pacientes morriam de doença metastática sendo a maioria



destas, pulmonares. A partir desta data foi introduzida quimioterapia adjuvante à cirurgia. Nos primeiros estudos as drogas mais utilizadas foram metotrexate em altas doses e doxorubicina ou a combinação destas, nestas séries apesar da maioria dos pacientes terem sido submetidos a amputação, a sobrevida livre de doença em 05 anos para os pacientes submetidos apenas a cirurgia era de 15% e dos pacientes submetidos quimioterapia adjuvante de 40 a 60%. Em 1978 autores da Mayo Clinic (TAYLOR et al. 1985) apresentaram um estudo com 272 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidade tratados com amputação isolada no período de 1963 a 1974 e observaram diferentes prognósticos dependendo da época do tratamento. Pacientes tratados no período entre 1963 e 1965 tinham 14% de sobrevida livre de doença em 05 anos, entre 1966 e 1968 23%, entre 1969 e 1971 37% e entre 1972 a 1974 em 39% dos casos. Dessa forma se observou que o prognóstico do osteossarcoma havia mudado neste período e foi atribuído a introdução da quimioterapia adjuvante.

No período entre 1982 e 1984 LINK et al. (1986) um estudo multi-institucional de osteossarcoma randomizou pacientes com osteossarcoma de extremidade não metastáticos para amputação isolada ou para amputação seguida de quimioterapia e foi observado que o grupo da quimioterapia adjuvante apresentou maior sobrevida livre de doença (61% x 11%  $p=0,005$ ) sem diferença na sobrevida global.

### **Quimioterapia Neoadjuvante**

Com o desenvolvimento da quimioterapia neoadjuvante e adjuvante, avanços nas técnicas cirúrgicas e melhora dos estudos radiológicos, 90 a 95% dos pacientes podem ser submetidos a cirurgia com preservação do membro e reconstrução. A sobrevida em longo prazo e taxa de cura para doença não metastática passou a ser de 60 a 80%, e houve

diminuição do número de metástases pulmonares ou atraso no seu aparecimento (WITTIG et al. 2002).

Os resultados de 20 estudos neoadjuvantes sendo 10 destes monoinstitucionais e 10 multicêntricos entre 1985 a 1995 evidenciaram uma taxa de tratamento conservador de 60%, 78% de sobrevida livre de doença em pacientes com grau de necrose  $> 90\%$  (bons respondedores) versus 38% em pacientes com grau de necrose  $< 90\%$  (pobres respondedores) (BACCI et al. 2001).

O tratamento padrão de quimioterapia agora inclui tratamento neoadjuvante e adjuvante. A finalidade da quimioterapia pré-operatória é tratar o tumor primário induzindo a necrose, facilitar a ressecção cirúrgica com margens adequadas, aumentar as taxas de preservação de membro, oferecer tratamento precoce de doença micrometastática e permitir a identificação de grupo de risco conforme o grau de resposta pós ressecção do tumor primário. Porém o maior risco da quimioterapia neoadjuvante é atrasar o procedimento cirúrgico naqueles tumores não respondedores, o que aumenta a possibilidade de disseminação sistêmica de células tumorais resistentes a drogas (WITTIG et al. 2002). Vários autores relatam forte associação entre a necrose induzida pela quimioterapia primária ou neoadjuvante e o prognóstico (ROSEN et al. 1982; DELEPINE et al. 1988; BACCI et al. 1990; SAETER et al. 1991; MEYERS et al. 1992; PROVVISOR et al. 1997; BACCI et al. 1998a ou b; FUCHS et al. 1998; BACCI et al. 2001a). A possível explicação entre a necrose e o prognóstico é que o tumor primário e as micrometástases tenham a mesma sensibilidade.

Atualmente não se sabe com clareza se esquemas de quimioterapia com associação de várias drogas são mais efetivos que esquemas com apenas duas drogas. O estudo do European Osteosarcoma Intergroup (EOI) não demonstrou diferença na sobrevida livre de doença ou sobrevida global entre esquema com 02 drogas (doxorubicina e cisplatina) e com 07 drogas (metotrexate, cisplatina, doxorubicina, vincristina, BCD – bleomicina, ciclofosfamida e dactinomicina) (BACCI et al. 2001a). Dentre as drogas mais usadas estão a

doxorrubicina, cisplatina e alta dose de metotrexate tanto como tratamento de indução (neoadjuvante) quanto adjuvante e alguns estudos recentes têm associado ifosfamida ao regime convencional, mas o benefício na sobrevida não foi observado.

### **Quimioterapia neoadjuvante x adjuvante**

O aumento da sobrevida livre de doença observada em estudos iniciais com a quimioterapia pré-operatória deve estar mais relacionado ao uso de regimes de quimioterapia mais efetivos com dose maiores do que a quimioterapia pré-operatória em si. A contribuição do momento da quimioterapia foi estudada pelo Pediatric Oncology Group (GOORIN et al. 2003) que comparou a realização da quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante) com a quimioterapia realizada após a ressecção do tumor primário (adjuvante) em pacientes portadores de osteossarcoma não metastáticos. O achado foi que a quimioterapia foi efetiva em ambos os grupos, com similar frequência de preservação de membro e sem vantagem de sobrevida livre de eventos para quimioterapia neoadjuvante. Alguns investigadores mantêm a recomendação da quimioterapia neoadjuvante pela informação prognóstica obtida pelo espécime cirúrgico, identificação de grupos de risco (WINKLER et al. 1984; WEINER et al. 1986; MEYERS et al. 1992; BACCI et al. 1993) e por acreditar no aumento do número de candidatos a cirurgia conservadora, mesmo sem aumentar a sobrevida global ou livre de eventos. Porém a prevenção de progressão de doença precoce independe se a quimioterapia é administrada no pré ou pós-operatório (GOORIN et al. 2003).

### **Quimioterapia intra-arterial x sistêmica**

A cisplatina é considerada a droga mais indicada para infusão intra-arterial por duas razões principais: não estar associada a grandes complicações locais e devido aos níveis das

drogas sistêmicas não serem comprometidos pela infusão intra-arterial (STEWART et al. 1983; MANGUES et al. 1988; BIELACK et al. 1988). Quando usada intra-arterial a cisplatina é mais efetiva no tumor primário que a infusão intravenosa (JAFFE et al. 1983). No estudo do COSS-86 (FUCHS et al. 1998) compararam cisplatina intra-arterial com cisplatina intravenosa associada a poliquimioterapia e evidenciaram taxa de resposta bem como a sobrevida livre de evento semelhante, porém no subgrupo tratado com cisplatina endovenosa os pacientes que receberam a cisplatina que a infusão mais prolongada (5h x 1h) obteve maior taxa de bons respondedores (68% x 47% p=0,04). (BACCI et al. 2000b), também demonstraram resultado semelhante quando comparou a cisplatina intrarterial com a poliquimioterapia com 03 drogas, porém quando foi associada uma quarta droga esta vantagem desapareceu e nenhuma diferença na taxa de sobrevida livre de eventos, tempo e sítio de recaída foi encontrada. Assim concluiu-se que mesmo com poliquimioterapia sistêmica a quimioterapia intrarterial com cisplatina não parece aumentar a resposta do tumor local e a taxa de cura.

### **Dose Recebida e Intensidade de dose**

Vários estudos retrospectivos têm focado o potencial da intensidade de dose em osteossarcoma como: SMITH et al. (1991) que associou a intensidade de dose da doxorrubicina e a necrose tumoral, DELEPINE et al. (1988 e 1996) que relacionou a intensidade de dose do metotrexate a sobrevida livre de doença e WITTIG et al. (2002) que associou quimioterapia com múltiplas drogas e quimioterapia de dose intensa com maior sobrevida livre de doença. Porém LEWIS et al. (2000) não conseguiu este benefício.

### **Quimioterapia em alta dose**

Alguns fatores têm sido considerados de alto risco em osteossarcoma como doença metastática, grandes tumores ou tumores de esqueleto axial e pacientes com doença recidivada após o tratamento inicial. Há pouca experiência de consolidação com terapia de alta dose, porém os resultados até o momento não evidenciaram benefício (MEYERS 2004).

### **Cirurgia**

O tratamento cirúrgico deve ter como objetivo o efeito cosmético e funcional, sem prejudicar a sobrevida a longo prazo.

A cirurgia conservadora consiste na preservação do membro e pode ser oferecida como uma alternativa de tratamento se o tumor primário puder ser ressecado com margens adequadas, sem comprometer a função do membro (PETRILLI et al. 1991 b; GARCIA et al. 1996). A sobrevida em longo prazo de pacientes submetidos à cirurgia conservadora com margens adequadas é semelhante àqueles submetido à amputação (RODRIGUEZ 1996; MEYERS e MACKENZIE 2004). A presença de doença metastática não afeta necessariamente a escolha do procedimento cirúrgico e a cirurgia conservadora pode ser oferecida. Algumas situações podem dificultar a cirurgia conservadora como, biópsia que contamina as partes moles adjacentes, envolvimento de estruturas neuro-vasculares e fratura patológica. A fratura patológica nem sempre é contraindicação de preservação do membro e vasos sanguíneos podem ser reconstituídos. A contaminação de partes moles pode limitar a realização da cirurgia conservadora, bem como envolvimento de nervos como ciático ou plexo braquial que são contraindicação absoluta do procedimento (LOPES et al. 1993). A obtenção de margem adequada é fundamental para escolha do procedimento cirúrgico. Esta margem em tumores metafisários não deve exceder 01 cm da placa de crescimento para

manutenção do potencial de crescimento normal após a cirurgia (HOFFER et al. 2000; MEYER e MACKENZIE 2004). Para tumores diafisários a margem de 03 a 05 cm do osso normal é necessária para evitar margem positiva. O cirurgião deve balancear a obtenção de margem cirúrgica segura e a manutenção de osso suficiente para realização do procedimento de reconstrução com sucesso (REFAAT et al. 2002). A recorrência local é associada com prognóstico extremamente reservado e associada a recaída sistêmica (BACCI et al. 1998a ). Dessa forma pacientes submetidos à cirurgia conservadora com margens inadequadas devem ser submetidos a uma segunda intervenção, particularmente se pobre respondedores a quimioterapia (BACCI et al. 2001). A cirurgia conservadora porém tem maior taxa de complicação como infecção, soltura, fratura, perda da prótese e recorrência local que a cirurgia de amputação (REFAAT et al. 2002).

A escolha do procedimento de preservação do membro depende da localização e da extensão do tumor, considerações psicológicas e da idade do paciente (MEYERS 2004).

A maioria dos cirurgiões prefere as reconstruções com endopróteses metálicas que permitem uma fixação imediata estável, deambulação precoce, sustentação do peso e uma boa estabilidade articular, com bons resultados funcionais na maioria dos pacientes e mínimas complicações pós-operatórias (MALAWER e CHOU 1995; KAWAI et al. 1998; HENSHAW et al. 1999; RUBERT et al. 1999).

### **Doença Avançada**

Pacientes com doença avançada ou irressecável ao diagnóstico, apesar do prognóstico reservado não necessariamente são incuráveis. Na década de 70 a sobrevida livre de progressão neste grupo de pacientes era menor que 20%, atualmente para pacientes com doença metastática pulmonar a sobrevida em 05 anos é maior que 40%. Porém a sobrevida mediana após o diagnóstico de metástases geralmente é curta, contudo 20 a 25% dos

pacientes vivem mais de 02 anos. O tratamento inclui remoção cirúrgica do tumor primário e/ou da doença metastática ao diagnóstico ou após poliquimioterapia intensiva. Entretanto em pacientes com metástases ósseas o prognóstico é mais reservado.

A doença localmente avançada consiste no envolvimento difuso do membro, de estruturas adjacentes, neurovascular ou outros, como parede torácica ou vértebra, que impede um tratamento locorregional adequado. A recorrência loco-regional representa falha a cirurgia primária ou a quimioterapia e pode estar associada a piora da qualidade de vida e limitação funcional. Os sintomas mais freqüentes nesta situação são: dor, sepsis, ulceração tumoral, hemorragia, trombose, fraturas patológicas e impotência funcional, nesta situação o tumor tende a ser quimioresistente e as vezes é necessária amputação de resgate. Doença metastática difusa é geralmente uma condição incurável e requer tratamento paliativo. Os locais mais acometidos são pulmão, osso, fígado e cérebro e quando este acometimento é difuso dificilmente a quimioterapia ou cirurgia serão efetivas.

### **Opções de tratamento para a doença avançada ou recorrente**

Várias combinações de drogas tem sido utilizadas em pacientes com doença metastática tratada ou não tratada, o mais efetivo deles consiste em cisplatina, doxorubicina e metotrexate em altas doses mais leucovorin tanto em regimes com duas ou três drogas. Vários estudos fase II reportam taxa de resposta de 25 a 35%.

A radioterapia tem papel limitado pela radiorresistência e pela necessidade de doses elevadas para resposta clínica e pode ser utilizada paliativamente para controle alérgico.

### **Tratamento específicos**

#### **Amputação paliativa do membro envolvido**

É uma opção na doença recorrente ou persistente refratária a quimioterapia e radioterapia, tanto na presença ou ausência de metástases. Principalmente se sintomas como

dor intensa, fraturas, úlcera persistente, infecção refratária, sangramento e incapacidade funcional estão presentes.

O sucesso da amputação paliativa ocorre quando há melhora do performance status, do controle dos sintomas, redução dos sinais da doença e a reabilitação do paciente (MERIMSKY et al. 2004).

### **Ressecção de Metástase Pulmonar**

A recorrência de osteossarcoma é mais comum em pulmão. Pacientes com doença recorrente confinada ao pulmão devem ser submetido à ressecção cirúrgica com ou sem quimioterapia. A ressecção da doença pulmonar completa consiste no mais importante fator prognóstico na primeira recaída com sobrevida em 3-5 anos de 20 a 40%, e após 05 anos de 23-31% (DUNN e DEHNER 1977; MERIMSKY et al. 2004). Dentre os fatores favoráveis para a ressecção completa estão número de nódulos pulmonares de 4 ou menos, metástase pulmonares unilaterais ou longos intervalos entre a ressecção do tumor primário e a metástase. A quimioterapia também tem papel importante nesta situação pois, DUNN e DEHNER (1977) e YAMAGUCHI et al. (1988) relataram com esta, redução do número e atraso no aparecimento das metástases bem como maior sobrevida.

### **3.12 MECANISMOS DE INVASÃO E METÁSTASES**

O processo de carcinogênese se subdivide em três etapas básicas, que são a iniciação, a promoção e a progressão. Na primeira etapa, sob a 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. E na terceira etapa ocorre a progressão tumoral, que corresponde à capacidade desse

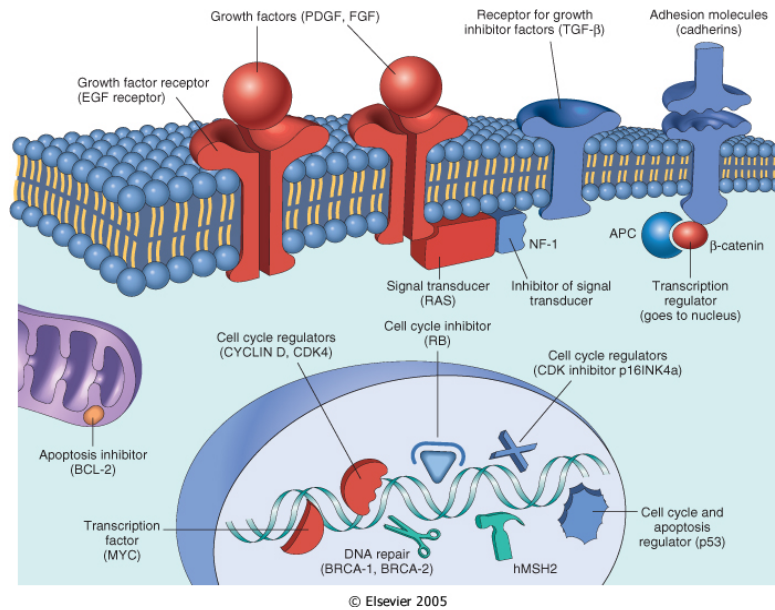


clone de células transformadas de invadir e metastatizar. Essa capacidade de invasão e de gerar metástases é responsável pela maior parte da morbidade e mortalidade causada pelo tumor ao hospedeiro.

O mecanismo de progressão, por sua vez, é subdividido em quatro etapas (MEYER e HART 1998): 1- Escape de células da massa tumoral primária e invasão dos tecidos adjacentes; 2- Embolização vascular; 3- Adesão nas células endoteliais de sítios distantes; 4- Invasão, angiogênese e crescimento nos sítios distantes. Na etapa inicial desse processo, a célula perde a capacidade normal de aderir às células adjacentes e à matriz extracelular e inicia a progressão. Essa adesão é mediada por diversas moléculas, pertencentes a diferentes grupos, quais sejam: integrinas, caderinas, superfamília das imunoglobulinas, selectinas e CD44 (DUFFY 1998). Em diversos tecidos a adesão célula-célula é mediada em grande parte por moléculas da família das caderinas. A principal representante dessa classe de moléculas é a caderina tipo E, que é o tipo expresso nos epitélios, tecidos que originam cerca de 80% a 90% dos cânceres humanos (CRISTOPHORI e SEMB 1999).

### **3.13 MÉTODOS IMUNOISTOQUÍMICOS**

Os métodos imunoistoquímicos baseiam-se na detecção de antígenos cuja expressão tenha relação qualitativa ou quantitativa com uma ou mais fases do ciclo celular (Figura 3).



Fonte: COTRAN et al (2005).

**Figura 3** - Localização celular e funções das maiores classes de genes associados ao câncer.

### 3.13.1 Caderinas

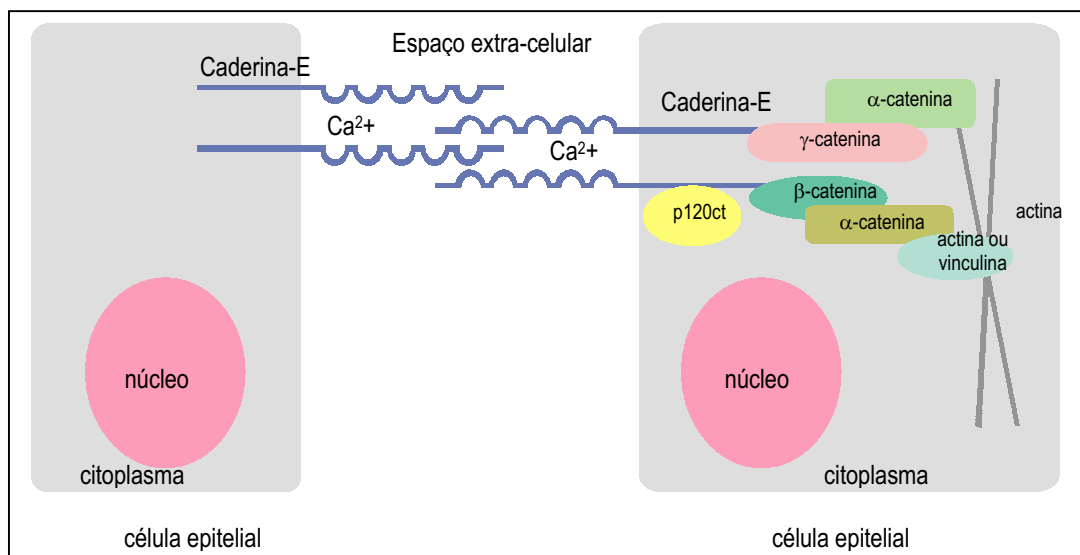
#### Tipos e estrutura molecular

As caderinas são moléculas de adesão célula-célula presentes em tecidos de vertebrados, cuja ação é dependente do cálcio. Existem diversos tipos de caderinas. O nome de cada uma delas depende do tecido onde originalmente foram descritas: caderina P, encontrada inicialmente na placenta; caderina H, no coração; caderina N, em tecido nervoso e caderina-E em tecidos epiteliais. Esta última é o tipo mais estudado (ALBERTS et al. 1997).

As caderinas são glicoproteínas de membrana formadas por 700 a 750 aminoácidos. A sua molécula é dividida em três porções: extracelular, transmembrana e intracelular (Figura 4). A maior parte da cadeia polipeptídica é extracelular e composta por cinco domínios, cada um contendo cerca de 100 aminoácidos. Esses domínios são homólogos e contém os sítios de ligação para o cálcio. Essa porção extracelular realiza interações homotípicas dependentes de cálcio com as caderinas das células vizinhas funcionando como

um verdadeiro "zipper molecular" (CHRISTOFORI e SEMB 1999; HAJRA e FEARON 2002) (Figura 4).

Na ausência de cálcio, as caderinas sofrem uma alteração conformacional e, como resultado, são rapidamente degradadas por enzimas proteolíticas (ALBERTS et al. 1997). A porção intracelular da caderina E se liga a filamentos de actina ou a filamentos intermediários do citoesqueleto, dependendo de qual estrutura de adesão estão fazendo parte. Essa ligação da caderina à actina é mediada, por sua vez, pelas cateninas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  cateninas) e pela molécula p120 ctn, também denominada de  $\delta$  catenina. Qualquer quebra no complexo intracelular caderina-E/cateninas causa perda da adesão intercelular (HAJRA e FEARON 2002).



Fonte: HAJRA e FEARON (2002).

**Figura 4** - O complexo de adesão celular mediado pelas caderinas.

### **Papel das caderinas na manutenção da estrutura dos tecidos**

As caderinas são as principais moléculas de adesão dos epitélios. Fazem parte de dois tipos de estruturas de adesão célula-célula: zonas de aderência, quando as moléculas de

caderina se ligam a filamentos de actina através das cateninas; e desmossomos quando as caderinas se ligam a filamentos intermediários através de outras moléculas que não as cateninas (ALBERTS et al. 1997).

Estas estruturas de adesão são de suma importância na manutenção da integridade dos epitélios. Em algumas doenças como o pênfigo, o indivíduo produz anticorpos contra suas próprias caderinas, levando ao rompimento dos desmossomos entre as células epiteliais. Isto causa extravasamento de fluídos para o epitélio frouxo, levando a intenso edema. A remoção in vitro do cálcio extracelular também leva ao rompimento dos tecidos (ALBERTS et al. 1997).

As caderinas exercem influências também na manutenção da forma e da polaridade das células em um tecido. Essas influências são decorrentes da sua interação com as moléculas de actina que compõem o citoesqueleto (HAJRA e FEARON 2002).

### **Alterações das caderinas relacionadas à progressão tumoral**

Vários tipos de moléculas de adesão celular estão implicadas no processo de carcinogênese. Algumas dessas moléculas têm a sua produção aumentada durante esse processo, facilitando, por exemplo, a adesão da célula tumoral às células endoteliais. Outras moléculas, como as caderinas, têm a sua expressão diminuída, o que facilita a evasão da célula tumoral do seu sítio primário. Existem vários trabalhos experimentais correlacionando a perda da expressão da caderina com a alteração do fenótipo de células epiteliais, que perdem diferenciação e adquirem comportamento invasivo.

Inicialmente, experimentos in vitro demonstraram que células epiteliais renais MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) que normalmente se organizam em uma camada única bastante coesa, sofriam perda da diferenciação, adotavam morfologia fibroblástica e

tornavam-se invasivas em gel de colágeno após a aplicação de anticorpos monoclonais contra caderina-E (BEHRENS et al. 1993).

PERL et al. (1998), estudaram a expressão imunoistoquímica da caderina E em camundongos transgênicos (Rip1 Tag 2) que servem como modelo experimental de carcinoma pancreático de células  $\beta$ , e verificaram que a perda da expressão da caderina E coincide com a transição de adenoma bem diferenciado para carcinoma invasivo. O cruzamento desses camundongos (Rip1 Tag 2) com camundongos que mantinham a expressão da caderina-E (Rip1 E cad) gerou uma linhagem de camundongos que também mantinham a expressão da caderina e nos quais o processo de carcinogênese estacionava na fase de adenoma.

Vários trabalhos clínicos correlacionam a perda ou diminuição da expressão da caderina-E com o maior risco de invasão e metástases nos mais diversos tipos de tumores.

UMBAS et al. (1992), observou diminuição da expressão da caderina E em pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata quando comparou tumores localizados e metastáticos e com o aumento do escore de Gleason dos tumores ( $p < 0,001$ ).

Em carcinoma de células escamosas de esôfago, INADA et al. (1999) encontraram correlação significativa entre diminuição da expressão imunoistoquímica da caderina-E e maior risco de metástases linfonodais, invasão vascular, maior profundidade de invasão, maior estadio patológico e pior prognóstico.

LEE et al. (2002), correlacionou menor expressão da caderina com estadio avançado, perda da diferenciação e invasão tumoral em pacientes portadores de tumores pequenos de pulmão ( $< 3$  cm) do tipo não pequenas células.

RODRIGO et al. (2002) relatou a expressão diminuída da caderina e maior risco de metástases linfonodais ( $p=0.007$ ) em carcinomas de células escamosas da laringe supra-glótica.

### **Regulação da expressão das caderinas**

O gene que condiciona a expressão da caderina-E se encontra no cromossomo 16 q (UMBAS et al. 1992). Esse gene foi denominado CDH1 e várias mutações somáticas foram descritas em diversos tumores, tais como neoplasias de estômago, de próstata, de mama e coloretais (HAJRA e FEARON 2002).

A expressão das caderinas também pode ser regulada por mecanismos epigenéticos. CHANG e WERB (2001) demonstraram que em pacientes com carcinomas de língua a hipermetilação do promotor do gene da caderina-E foi a principal causa da diminuição da sua expressão. Os fatores de transcrição são capazes de inibir a expressão da caderina-E em células de carcinomas de mama tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Essa inibição foi mediada pela ligação dos fatores de transcrição a regiões promotoras específicas (E box) do gene da caderina (HAJRA e FEARON 2002).

### **Caderinas e Osteossarcoma**

As moléculas de adesão celular são importantes não só no processo de manutenção da arquitetura do tecido normal, mas também na progressão do carcinoma que inclui a alteração da morfologia, invasão e metástase. O gene das caderinas é expresso no osteoblasto normal (o termo caderina do osteoblasto, OB-caderina) tanto no osteoblasto do rato da linhagem celular MC3T3-E1 quanto no cDNA do osteossarcoma humano. A OB -caderina é conhecida ser idêntica a caderina -11 clonada do c-dna cerebral. A caderina-11 apresenta três isoformas: 1) forma intacta que mostra 50% de aminoácido idêntico ao da N-caderina, 2) a forma variante gerada por splicing alternativo e 3) a forma secretada gerada por proteólise. A forma intacta consiste em uma proteína de 120KD com propriedade de adesão celular em associação a catenina, adesão homofílica e dependente de cálcio. A forma variante é caracterizada por inserção de 179bp no domínio transmembrana, resultando em uma região

citoplasmática mais curta e diferente da forma intacta que não tem propriedade adesiva. E a forma secretada da caderina-11, proteína de 80-kd encontrada em sobrenadante de células osteoblasto-like e células L transfectantes da caderina-11 intacta, o que sugere que a forma secretada deriva de uma forma intacta (a partir clivagem de uma proteína). Tanto a caderina-11 quanto a N-caderina são expressas em baixos níveis em osteossarcoma, enquanto em osteoblastos normais apresentam-se em níveis mais elevados. Isto sugere que a expressão reduzida das formas intactas de caderina-11 e N-caderina causa invasão local em osteossarcoma. A expressão anômala de caderina-11 e a redução da expressão de N-caderina em osteossarcoma é responsável por vários mecanismos de expressão e disfunção. A diminuição da forma intacta é induzida pela superexpressão da forma variante e da forma secretada, e esta forma secretada pode impedir a função da forma intacta (KASHIMA et al. 1999). Alteração na expressão das caderinas pode estar relacionada a metástases e morfologia do osteossarcoma (KASHIMA et al. 1999; MONAGHAN et al. 2001; KASHIMA et al. 2003).

### **3.13.2 Gene APC / $\beta$ -catenina**

O gene APC é um gene relativamente grande o qual codifica uma molécula de RNAm e uma proteína de 2843 aminoácidos na sua isoforma mais comum. A proteína é estruturalmente complexa com vários possíveis sítios de interação para B-catenina, EB1 e axina (RUBINFELD et al. 1997). O APC participa de várias funções celulares incluindo proliferação, diferenciação, apoptose, adesão, migração e segregação cromossômica (VAN ES et al. 2001).

O produto do gene APC é parte do complexo multiprotéico que regula a concentração citoplasmática de B-catenina, a qual tem duas maiores funções: adesão celular e transmissão de sinal de proliferação da via WNT. Sob circunstâncias normais o gene APC se liga diretamente a B-catenina livre e promove a fosforilação pela glicogênio sintetase

quinase 3b (GSK-3 $\beta$ ) e atua sobre o alvo a B-catenina que é degradada pelo sistema de proteasoma (ABERLE et al. 1997; YANG et al. 2005). Contudo quando há mutação no gene APC ou do gene B-catenina, especialmente na região de fosforilação da GSK-3, o gene APC deixa de se ligar a B-catenina e esta se acumula no citoplasma e núcleo. No núcleo, a B-catenina se liga diretamente ao fator de célula T/linfóide estimulando a transcrição de genes alvos. O c-myc, (YANG et al. 2005) ciclina D1 e fibronectina tem sido identificadas como genes alvos da via APC-B catenina. A superexpressão do c-myc e/ou ciclina D1 é frequentemente demonstrada em cânceres humanos e a fibronectina tem papel importante na metástase do câncer (RAMBURAN et al. 2005).

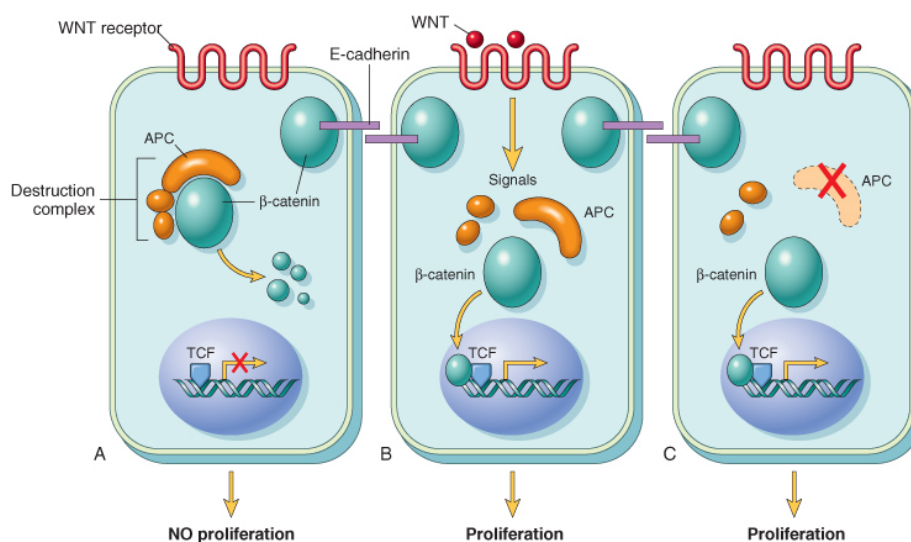
### **Via APC / $\beta$ -catenina**

Os produtos dos genes supressores de tumor podem atuar na regulação sinais promotores de crescimento. Mutações na linhagem germinativa do gene APC no loci (5q21) são associadas a tumores benignos que são precursores de carcinoma. Essa alteração ocorre no câncer de cólon onde indivíduos que nascem com um alelo do APC mutante desenvolverão pólipos adenomatosos, durante a sua adolescência e invariavelmente um ou mais destes pólipos irão sofrer transformação maligna.

O APC é um componente da via de sinalização WNT cujo maior papel é de controlador celular de adesão e polaridade durante a embriogênese. A via de sinalização WNT também é importante na auto-renovação das “stem cell” hematopoiéticas. Os sinais da WNT atuam sobre os receptores da superfície celular, chamados “frizzled” e estimulam várias vias sendo uma central envolvendo  $\beta$ -catenina e APC. Um função importante do APC é “down regulate” da  $\beta$ -catenina. Assim na ausência de sinalização WNT, ocorre a formação de um complexo macromolecular com a  $\beta$ -catenina, o qual resulta na degradação da B-catenina pelo APC, o que leva a diminuição dos níveis intracelulares de  $\beta$ -catenina,



prevenindo o acúmulo no citoplasma. A inativação do APC leva a uma ruptura do complexo, não ocorre a degradação da  $\beta$ -catenina e ocorre o aumento dos níveis celulares e translocação desta para o núcleo. Ao translocar para o núcleo a  $\beta$ -catenina forma um complexo com TCF (fator de transcrição) que aumenta a transcrição do c-myc, cyclina D1 e outros genes promotores do ciclo celular (Figura 5).



Fonte: COTRAN et al. (2005).

**Figura 5** - O papel do APC na regulação da estabilidade e função da  $\beta$ -catenina.

A importância da via de sinalização APC- $\beta$ -catenina na tumorigênese é atestada em pacientes portadores de câncer de cólon que podem ter genes APC normais e mutações na  $\beta$ -catenina. A  $\beta$ -catenina mutada não é inibida pelo APC e migra para o núcleo. Mutações de  $\beta$ -catenina não são restritas a tumores de cólon, estão presentes em mais de 50% dos hepatoblastomas e aproximadamente em 20% dos carcinomas hepatocelulares. A  $\beta$ -catenina se liga a E-caderina que mantém a adesividade intercelular. A redução da adesividade em células de câncer podem resultar de defeitos no eixo caderina-catenina. O efeito da adesividade celular da  $\beta$ -catenina independe do fator de transcrição (WEI et al. 2000). A expressão imunohistoquímica da  $\beta$ -catenina tem sido investigada em vários tumores onde a perda ou o padrão aberrante tem sido associado a desdiferenciação e pobre prognóstico. Em nefroblastoma a  $\beta$ -catenina tem localização na membrana em 88% dos casos e foi expressa

não só no epitélio, quanto no mesenquima e no blastema. A realocização nuclear da  $\beta$ -catenina tem sido associada a pobre prognóstico em nefroblastoma e sarcoma sinovial. A redistribuição citoplasmática da  $\beta$ -catenina pode ser resultado tanto de sinalização do WNT, inativação do APC ou pela própria mutação direta da  $\beta$ -catenina. E estudo de Koesters, o acúmulo citoplasmático de  $\beta$ -catenina foi detectado em tumores poupados de mutação no gene da  $\beta$ -catenina. O acúmulo nuclear da  $\beta$ -catenina também tem sido visto em tumores que não possuem mutações na  $\beta$ -catenina, sugerindo defeitos em outros membros da via de sinalização WNT (KOESTERS et al. 1999).

### **APC/ $\beta$ -catenina e Osteossarcoma**

As cateninas participam no desenvolvimento e função da linhagem das células ósseas e osteoblastos. No osso as caderinas se associam a  $\beta$ -catenina e atuam na regulação da diferenciação do osteoblasto a qual é dependente da adesão célula-célula (CHENG et al. 1998; FERRARI et al. 2000). A perda da expressão de  $\beta$ -catenina em osteoblastos pode estar relacionada a fase de transição da diferenciação dos osteoblastos a osteócitos ou a um fenômeno de transformação celular. MONAGHAN et al. 2001, estudou nove casos de osteossarcoma 08 apresentavam expressão de  $\beta$ -catenina e todos padrão nuclear, porém 07 destes mostravam expressão de membrana e citoplasmática. Alguns estudos já descreveram alterações na expressão de  $\beta$ -catenina em sarcomas ósseos (IWAO et al. 1999), este achado de padrão nuclear pode estar associado a mutação do APC ou desregulação da via do gene de transcrição  $\beta$ -catenina /LEF/TCF importante nas alterações neoplásicas precoces.

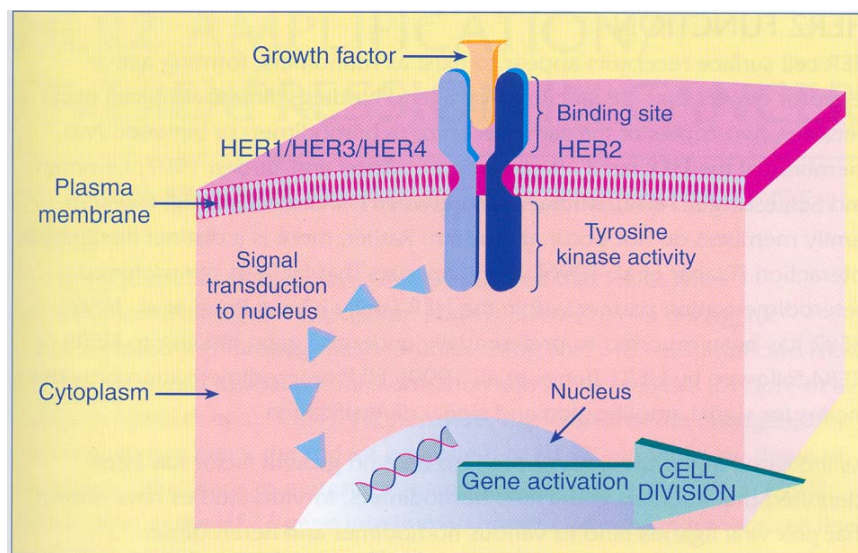
A literatura que associa APC com osteossarcoma é pobre. MONAGHAN et al. (2001) considera o papel do APC no osso ainda indefinido, mas segundo este parece ser similar a outros tecidos, compete com a caderina E pela ligação a  $\beta$ -catenina e pode regular o complexo caderina-catenina. Atuando com papel indireto na comunicação

intercelular da adesão célula a célula (osteócito-osteócito, osteócito-osteoblasto) e sugerindo ser importante na regulação do turnover ósseo. O efeito do APC na migração celular pode ser importante no recrutamento e localização das células de remodelação óssea como osteoblastos precursores e osteoclastos, bem como no potencial invasivo e metastático tumoral. Neste estudos dos nove casos de osteossarcoma todos apresentavam forte expressão de APC, porém este é o único relato da literatura que analisa a correlação expressão imunohistoquímica de APC e osteossarcoma. Não há até o momento outro estudo que correlacione os achados imunohistoquímicos da expressão de APC e dados clínicos.

### **3.13.3 c-erbB-2**

O gene c-erbB-2 se localiza no cromossomo humano 17q21 (FUKUSHIGE et al. 1986), codifica uma proteína receptora transmembrana de 185 KDa (p185) frequentemente chamada de proteína ou receptor HER2. O HER2 pertence a uma família dos receptores de fator de crescimento epidérmico, determinados de HER1 a HER4 (c-erbB-1 a c-erbB-4), que apresentam alto grau de homologia entre si.(COUSSENS et al. 1985; BARGMANN et al. 1986). Todos os quatro membros da família HER são receptores transmembrana tirosina quinase com atividade estimuladora de crescimento e importantes na regulação do crescimento celular, sobrevivência e diferenciação. Em comum com os outros membros da família HER, a proteína HER2 tem três domínios: um sítio de ligação ao receptor extracelular, um segmento transmembrana lipofílico e uma área intracelular com atividade tirosina quinase. O ligante se une ao complexo receptor heterodímero que inclui a proteína HER2 na superfície celular para ativar a atividade da proteína tirosina quinase e a autofosforilação da tirosina (Figura 6). Estes disparam a cascata de eventos que resultam na transmissão de sinais através da membrana celular e espaço intracelular até o núcleo, onde a ativação do gene ocorre e estimula o ciclo celular e a mitose (ALROY e YARDEN 1997). O

receptor HER2 atua como chave na via de transdução de sinal do fator de crescimento celular e no controle do crescimento e divisão normal da célula (AKIYAMA et al. 1986).



**Fonte:** van Der Geer et al 1994

**Figura 6** - Modelo esquemático de fases da via de transdução de sinal do fator de crescimento.

O gene *c-erbB-2* é um análogo humano do gene transformador *neu* originalmente encontrado em linhas celulares de neuroblastoma de ratos derivadas de tumores induzidos por etilnitrosuréia, e que quando hiperexpresso induz a transformação maligna em fibroblastos de roedores (DI FIORE et al. 1987). Da mesma forma que EGFR (família dos receptores de crescimento epidérmico, a proteína p185 tem intrínseca atividade tirosina quinase. O receptor HER2 pode estar envolvido na regulação de várias funções vitais controladas por qualquer membro da família dos receptores Erb, como crescimento celular, diferenciação e apoptose (YU e HUNG 2000). Desde a descrição original de SLAMON et al. (1987) mostrando a correlação entre a amplificação de *c-erbB-2* e agressividade biológica nos carcinomas mamários, foram descritos numerosos artigos na literatura acerca do valor prognóstico deste oncogene em vários tipos de neoplasias. Expresso em cerca de 30% dos

casos de carcinoma da mama invasivo, o c-erbB-2 tem correlação com a sobrevida, especialmente em pacientes com metástases axilares, sendo que se demonstrou também disseminação sistêmica com maior precocidade, especialmente para o fígado. Também em mama, lesões proliferativas de risco (CDIS- carcinoma ductal in situ) que expressam o c-erbB- estão relacionadas a alto grau nuclear e presença de necrose (OLIVERIA et al. 2004). A superexpressão do c-erbB-2 esta relacionada a aumento das propriedades metástase relacionadas (invasão, angiogênese, e aumento da sobrevida), além de conferir as células com câncer maior resistência a várias terapias sejam elas quimioterapia, hormonioterapia, radioterapia ou citoquinas. Esta resistência é mediada por receptores de sinal anti-apoptóticos (YU e HUNG 2000).

A superexpressão de c-erbB-2 também é reportada em pacientes com tumor de ovário, endométrio (SLAMON et al. 1987), estômago, glândula salivar (PRESS et al. 1994) cólon, rim e bexiga (NEAL et al. 1990; SATO et al. 1992), pâncreas (LEI et al. 1995), pulmão não pequenas células (TSAI et al. 1993; KIM et al. 1998). Todos estes tumores apresentam origem epitelial e mostraram que a expressão de c-erbB-2 é muito rara em tumores de origem mesenquimal, porém ONDA et al. (1996) demonstrou que a expressão deste ocorreu em 42% dos osteossarcomas.

A determinação de c-erbB-2 por imunistoquímica apresenta uma grande vantagem sobre o estudo de outros genes, já que na sua maioria dos casos a presença de uma coloração de membrana para o produto do c-erbB-2 e está associada a real amplificação do gene, como demonstrado por técnicas de biologia molecular. A imunistoquímica tem sido utilizada para detecção da proteína HER2 através do uso de anticorpos monoclonais ou policlonais (SLAMON et al. 1987). A utilização da imunistoquímica nos materiais de parafina tem mostrado que os tumores que apresentam amplificação do gene c-erbB-2 apresentam forte expressão de membrana, por exemplo nas pacientes em câncer de mama com número de genes c-erbB-2 normais não apresentam marcação específica (ISOLA et al. 1999; JIMENEZ

et al. 2000; WANG et al. 2000). A imunistoquímica pode discriminar entre os níveis de proteína HER2, associada com a amplificação do gene c-erbB2 e os níveis de proteína HER2 normal, é um método bastante utilizado e relativamente barato e tem mostrado uma boa concordância interlaboratorial e interobservadores (HOANG et al. 2000; JACOBS et al. 2000). O Herceptest DAKO é interpretado através de um “score” de marcação de membrana que varia de 0 a +3, o qual reflete a intensidade e o padrão do sinal imunistoquímico em > de 10% das células tumorais (Tabela 4).

**Tabela 4** - Score de superexpressão do HER2 usando o Kit Herceptest DAKO.

SCORE	Mensuração	Padrão de Marcação
0	negativo	Não há marcação, ou marcação de membrana observada em, 10% das células tumorais
+1	negativo	Marcação de membrana perceptível e detectada em > 10% das células tumorais . As células só marcam em parte da membrana.
+2	fraco	Marcação de membrana de fraca a moderada em > 10% das células tumorais
+3	forte	Marcação de membrana é forte em > 10% das células tumorais

**Fonte:** JACOBS et al. (1999); ROCHE e INGLE (1999).

Outro método utilizado para diagnóstico dos níveis de c-erbB-2 é o FISH – hibridização in situ por imunofluorescência (PRESS et al. 1997) cuja técnica é caracterizada pela utilização do DNA HER2 específico marcado com a digoxigenina, a qual após a hibridização do c-erbB-2 presente na amostra do tecido, é detectado por através da ligação com anticorpos marcados com fluoresceína para digoxigenina. Esta técnica é caracterizada por alta sensibilidade e reprodutibilidade, e por oferecer uma medida objetiva e qualitativa da amplificação do c-erbB-2 em adição pode ser realizada em pequenas amostras de tecido. Vários estudos tem demonstrado um nível de concordância de mais de 90% usando vários testes imunistoquímicos e os testes de FISH (ISOLA et al. 1999; JACOBS et al. 1999; HOANG et al. 2000; JIMENEZ et al. 2000; RIDOLFI et al. 2000; WANG et al. 2000).

### **c-erbB-2 e osteossarcoma**

Em um estudo com osteossarcoma, 42% das amostras expressavam c-erbB-2. A expressão desta proteína foi associada com a presença de metástases pulmonares e diminuição de sobrevida bem como uma pobre resposta histológica quimioterapia neoadjuvante (GORLICK et al. 1999). A expressão de c-erbB-2 é correlacionada com pior prognóstico em pacientes com expressão de +1 a +3 e a taxa de sobrevida após 01 ano foi de 61% e após 03 anos de 14%. Em contraste pacientes que não expressam c-erbB-2 a sobrevida em 01 ano foi de 100% e em 03 anos de 84%. Pacientes com expressão de c-erbB-2 apresentam alto risco de desenvolvimento de metástase, 06 meses após o diagnóstico ( $p < 0,005$ ) (GORLICK et al. 1999).

A expressão da proteína c-erbB-2 é associada a pobre prognóstico em pacientes com osteossarcoma não metastático, onde a superexpressão desta está associada a menor sobrevida livre de recorrência e aumento da probabilidade de metástases múltiplas, (ONDA et al. 1996; GORLICK et al. 1999).

## ***PACIENTES E MÉTODOS***

---



## **4 PACIENTES E MÉTODOS**

### **4.1 AMOSTRA DO ESTUDO**

Foram incluídos no estudo os pacientes admitidos no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo, no período de 1985 a 2000, com diagnóstico de osteossarcoma convencional de extremidades com doença metastática ou não ao diagnóstico.

#### **4.1.1 Critérios de inclusão**

1. Pacientes portadores osteossarcoma convencional de extremidade, metastático ou não ao diagnóstico, com confirmação histopatológica por biópsia do tumor primário seja por agulha ou cirúrgica.
2. Pacientes sem tratamento prévio.
3. Pacientes tratados neste serviço com cirurgia e/ou quimioterapia segundo os protocolos vigentes em cada época.
4. Disponibilidade de material arquivado em parafina suficiente para novos cortes histológicos e confirmação do diagnóstico.

#### **4.1.2 Critérios de exclusão**

1. Casos sem material disponível no arquivo de blocos de parafina para a realização adequada de novos cortes para coloração imunoistoquímica e/ou confirmação diagnóstica.
2. Pacientes que apresentaram outras neoplasias, sincrônicas ou metacrônicas.
3. Pacientes com osteossarcomas de outros sítios que não de extremidades.

4. Pacientes com tipos histológicos de osteosarcoma que não o convencional (Figura 1). Pacientes com osteossarcoma multifocal ou poliostótico
5. Margens cirúrgicas inadequadas.
6. Pacientes com recidiva locoregional.

Foram selecionados inicialmente os registros de 250 pacientes para o estudo. Após avaliação dos prontuários 186 pacientes permaneceram elegíveis para análise. Realizado seleção de blocos de parafina e lâminas para confirmação diagnóstica. Destes, 104 blocos estavam disponíveis, sendo que 97 pacientes constituíram a amostra para a análise final. Dentre os motivos que levaram a redução do número de pacientes inicialmente selecionados e a amostra final foram a falta do bloco de parafina do tumor primário e a falta de material adequado para realização imunoistoquímica.

## **4.2 METODOLOGIA**

Trata-se de um estudo retrospectivo cujos dados clínicos e epidemiológicos foram obtidos dos prontuários médicos arquivados no SAME - Serviço de Arquivo Médico e Estatística do Centro de Tratamento e Pesquisa - Hospital do Câncer A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente de São Paulo.

Os dados coletados dos 97 pacientes portadores de osteossarcomas foram registrados em uma ficha de levantamento de dados previamente definida (Anexo 1).

A partir do material existente nos blocos de parafina realizaram-se novos cortes para a realização de coloração de Hematoxilina-eosina para confirmação do tipo histológico e marcação imunoistoquímica com c-erbB-2, APC e moléculas de adesão celular (Pancaderina, E-caderina e  $\beta$ -catenina).

#### **4.2.1 Diagnóstico**

Conforme protocolo institucional, todos os pacientes foram avaliados inicialmente por exame clínico geral, analisando-se os diversos aparelhos e sistemas e exame locorregional, no qual a lesão primária era caracterizada segundo a sua localização. Estes pacientes eram submetidos a exames clássicos de estadiamento, conforme preconizado para o diagnóstico e tratamento segundo a época.

A suspeita clínica foi confirmada sempre pela biópsia da lesão. O material de biópsia obtido foi fixado em formalina a 10 % e incluído em parafina. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina. Quando os pacientes já haviam sido biopsiados em outras instituições, as lâminas foram submetidas à revisão anatomopatológica sistemática e os blocos de parafina solicitados e arquivados para a realização de novos cortes. Nos casos de biópsia realizada em outro serviço cujo material era pouco elucidativo para o diagnóstico, nova biópsia era realizada.

Baseado no tipo predominante celular e material intercelular (osteóide, cartilagem, colágeno) o osteossarcoma foi classificado como osteoblástico, condroblástico e fibroblástico respectivamente e posteriormente encaminhada para imunoistoquímica.

#### **4.2.2 Estadiamento**

O estadiamento clínico foi realizado pelo sistema TNM, 1998.

O estadiamento clínico inclui o exame físico, com exame detalhado locorregional, exames de imagem e por último, biópsia para confirmação diagnóstica. A avaliação locorregional foi realizada por tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética (conforme a indicação e a disponibilidade na época), a pesquisa de metástases pulmonares por tomografia computadorizada e cintilografia óssea para descartar doença disseminada óssea.

#### 4.2.3 Procedimento cirúrgico

Dos 97 pacientes avaliados, 91 foram tratados com cirurgia após a quimioterapia. Sendo estas consideradas conservadoras quando se preservava o membro afetado ou função, e cirurgias de amputação, quando era ressecado o membro afetado, ou não era preservado a função. A cirurgia também foi estratificada por período considerando cirurgias realizadas antes de 1990 e após 1990 considerando a possibilidade de mudança de filosofia neste período e a disponibilidade de endopróteses.

#### 4.2.4 Quimioterapia

Os pacientes foram submetidos aos protocolos de quimioterapia vigentes durante estes períodos e divididos em;

##### Grupo 1-Cisplatina/ Doxorrubicina

Cisplatina 100mg/m<sup>2</sup> IA x1 dia

Cisplatina 120mg/m<sup>2</sup> IV x1 dia (pós- operatória).

Doxorrubicina 30mg/m<sup>2</sup> IV x 2 dias

##### Grupo 2-Cisplatina/ Doxorrubicina/Metotrexate em altas doses

Cisplatina- 120mg/m<sup>2</sup> IV x1 dia

Doxorrubicina 30mg/m<sup>2</sup> IV x2 dias

Metotrexate 12g/m<sup>2</sup> (resgate com Leucovorin).

##### Grupo 3-Cisplatina/Doxorrubicina/ Ifosfamida/VP16

Cisplatina 120mg/m<sup>2</sup> IV x1 dia

Doxorrubicina 25mg/m<sup>2</sup> IV x 3 dias

Ifosfamida 1,8g/m<sup>2</sup> IV x 5dias

VP16 150mg/m<sup>2</sup> x 3 dias (Cisplatina).

100mg/m<sup>2</sup> IV x1 dia (Ifosfamida).

**Grupo 4-Cisplatina/ Doxorubicina/Carboplatina/Ifosfamida (Mesna).**

Cisplatina 100mg/m<sup>2</sup> IV x1 dia

Carboplatina 500mg/m<sup>2</sup> x 1dia

Doxorubicina 30mg/m<sup>2</sup> x2 dias

Ifosfamida 03g/m<sup>2</sup> IV x1 dia(Mesna).

Cisplatina 100mg/m<sup>2</sup> IV x1 dia

**Grupo 5-Cisplatina /Doxorubicina(EORTC).**

Cisplatina 100mg/m<sup>2</sup> IV x1 dia

Doxorubicina 25mg/m<sup>2</sup> IV x 3 dias

**Grupo 6-Ifosfamida /Cisplatina/Doxorubicina**

Ifosfamida 1,5g/m<sup>2</sup> x4 dias

Doxorubicina 60mg/m<sup>2</sup> x1 dia

Cisplatina 100mg/m<sup>2</sup> x1 dia

**Grupo 7-Outros****Grupo 8-Não fez quimioterapia****4.2.5 Seguimento dos Pacientes**

O acompanhamento dos pacientes se deu em consultas ambulatoriais regulares. A cada consulta era realizado exame físico geral e locorregional. As Radiografias de tórax eram realizadas conforme as consultas ou na vigência de sintomas.

Os pacientes foram classificados segundo o seguimento em:

- a) vivos sem câncer.
- b) vivos com câncer.
- c) mortos pelo câncer ou complicação do tratamento.
- d) mortos por outras causas .
- e) perdidos no seguimento.

#### 4.2.6 Exame anatomopatológicos do tumor primário

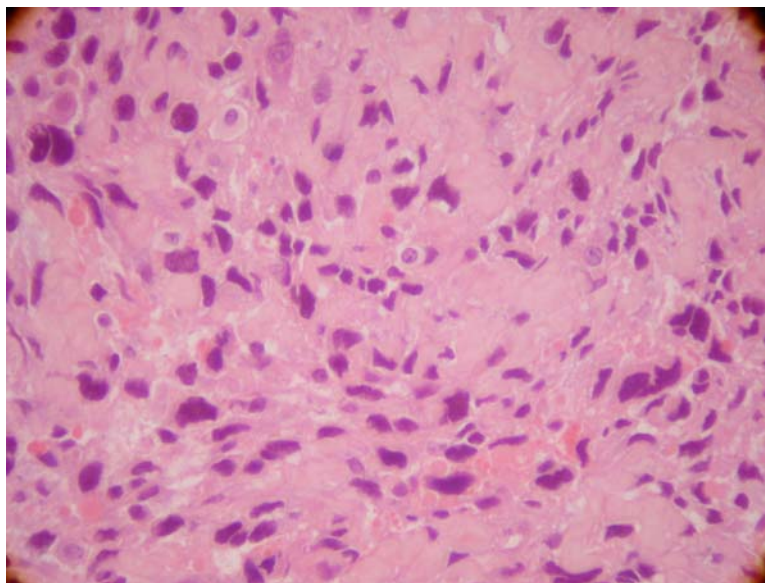
Todas as lâminas referentes à biópsia do tumor primário foram revistas por dois patologistas, Prof<sup>o</sup>. Dr. Fernando Augusto Soares e Dra Isabela Werneck da Cunha.

O tipo histológico foi revisto a partir do material de biópsia e classificadas segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (RAYMOND et al. 2002) (Tabela 1).

Neste estudo foram incluídos apenas os osteossarcomas convencionais com seus respectivos subtipos osteoblástico, condroblástico, fibroblástico e excluída as demais histologias.

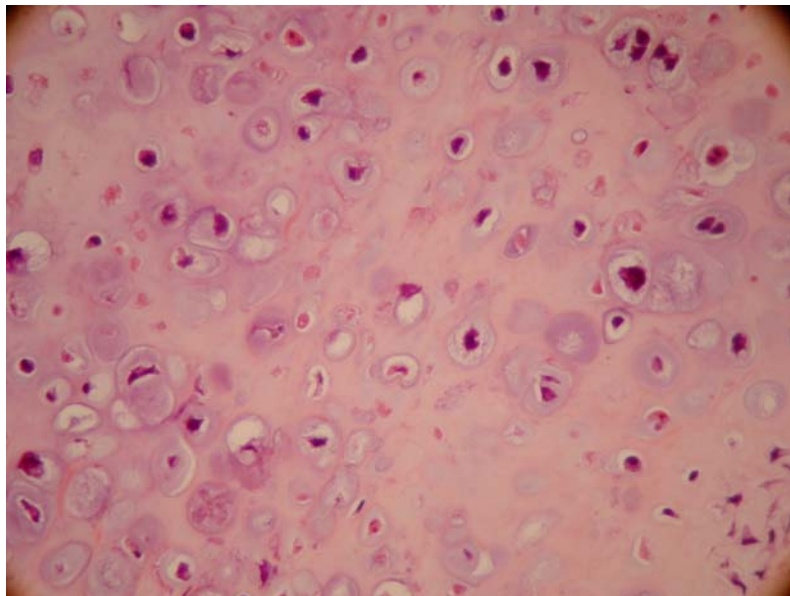
Foram classificados baseado no tipo celular predominante e material intercelular (osteóide, cartilagem, colágeno) em:

**Osteossarcoma Osteoblástico:** A matriz predominante corresponde ao osso e osteóide, há extremos de produção de matriz desde fina a densa, osteóide compacto e osso (esclerótico) (Figura 7).



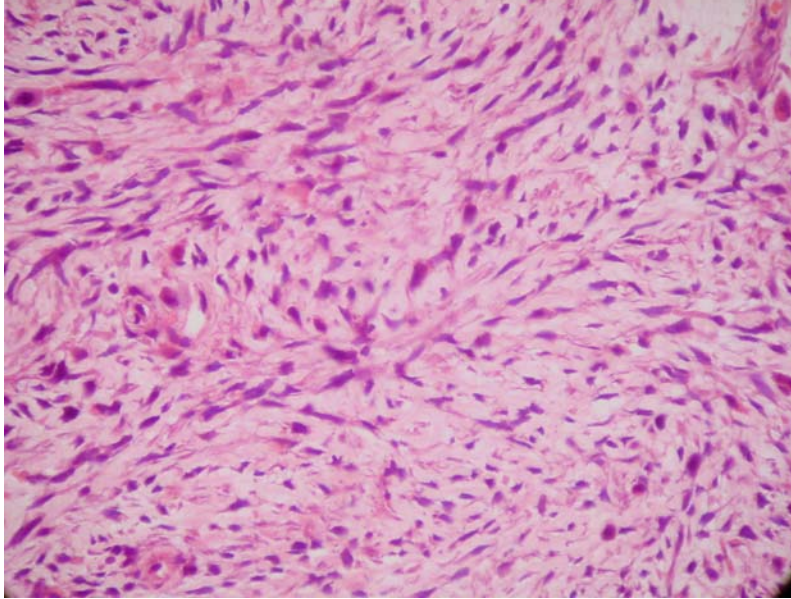
**Figura 7** - fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade subtipo osteoblástico. Hematoxilina-eosina, aumento 200x.

**Osteossarcoma Condroblástico:** A matriz condróide é predominante, há maior grau de cartilagem hialina as quais são intimamente associadas com elementos não condróides (Figura 8).



**Figura 8** - fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade subtipo condroblástico. Hematoxilina-eosina, aumento 200x

**Osteossarcoma Fibroblástico:** Caracterizado por células fusiformes malignas de alto grau com mínima quantidade de matriz óssea com ou sem cartilagem (Figura 9).



**Figura 9** - fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade subtipo fibroblástico. Hematoxilina-eosina, aumento 200x

As peças cirúrgicas foram fixadas em solução de formalina a 10%.

A resposta a quimioterapia foi avaliada pelo Grau de Necrose de HUVOS et al. (1977), conforme descrito no laudo anatomopatológico.

Grau I: pobre resposta ou sem efeito da quimioterapia

Grau II: resposta moderada com áreas de tumor osteóide acelular, necrose, fibrose atribuído ao efeito da quimioterapia;

Grau III: predomínio de áreas com tumor osteóide acelular, necrose, fibrose com foco discreto de células tumorais viáveis,

Grau IV: ausência de células tumorais viáveis

Os pacientes foram agrupados em dois grupos: grupo 1 (grau de necrose tumoral HUVOS I e II) e grupo 2 (Grau de necrose de HUVOS III e IV) considerados maus e bons



respondedores a quimioterapia, respectivamente conforme dados de literatura (RAYMOND et al. 1987; GLASSER et al. 1992).

Aqueles pacientes em que a gradação de HUVOS não pode ser aplicada foram considerados ignorados e agrupados em separados.

#### **4.2.7 Técnica de Imunoistoquímica**

Após pesquisa no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica, identificaram-se as lâminas histológicas referentes a biópsia do tumor primário. Estas foram revistas por dois patologistas (Prof. Dr. Fernando Augusto Soares e Dra. Isabela Werneck da Cunha), definindo o tipo histológico e selecionando a lâmina mais representativa da lesão.

Os blocos de parafina referentes a essas lâminas foram submetidos a novos cortes de 3 µm e montados em lâminas previamente tratadas com 3 aminopropil-trietoxi-silano (Sigma, A-3648, USA ) e deixados por 24 horas em estufa a 60°C para melhor adesão dos tecidos nas mesmas.

A desparafinização dos cortes foi realizada através de dois banhos sucessivos em Xilol, o primeiro a 60°C por 20 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos.

A reidratação foi feita com quatro banhos sucessivos em etanol a 100 %, a 95%, e a 70%, respectivamente, durante 30 segundos cada um. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada.

Procedeu-se, então, a recuperação antigênica em panela de pressão (Eterna®, Nigro). A solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 foi fervida na panela aberta e só então as lâminas foram mergulhadas e a panela lacrada com a válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, a válvula de segurança foi abaixada e aguardado a pressurização total. As lâminas permaneceram por cinco minutos após a pressurização. A panela ainda fechada foi lavada por dez minutos em água corrente e depois de destampada, foi deixada por dez

minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas novamente em água corrente e destilada.

A peroxidase endógena foi bloqueada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada. Nova lavagem em água corrente e destilada e na seqüência um banho com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em título preestabelecido conforme Tabela 5, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, USA) e azida sódica (NaN<sub>3</sub>) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

**Tabela 5** - Descrição do anticorpo primário utilizado, clones, título de diluição e fabricantes.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Polyclonal rabbit anti-human c-erbB-2 oncoprotein	–	1/500	DAKO –AO485
Monoclonal mouse anti-human E-cadherin	NCH-38	1/100	DAKO –M3612
Polyclonal pan-cadherin	–	1/3000	SIGMA C3678
Polyclonal (C20) APC	–	1/600	SCruz – SC 896
β-catenina	14	1/1000	BD Transduction – 610154

As lâminas foram novamente lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e então incubadas com o anticorpo secundário biotilado-reagente C (Biotinylated goat anti-mouse/rabbit Ig) do kit StreptABCComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, K492, Denmark) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C. Após procedido nova lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

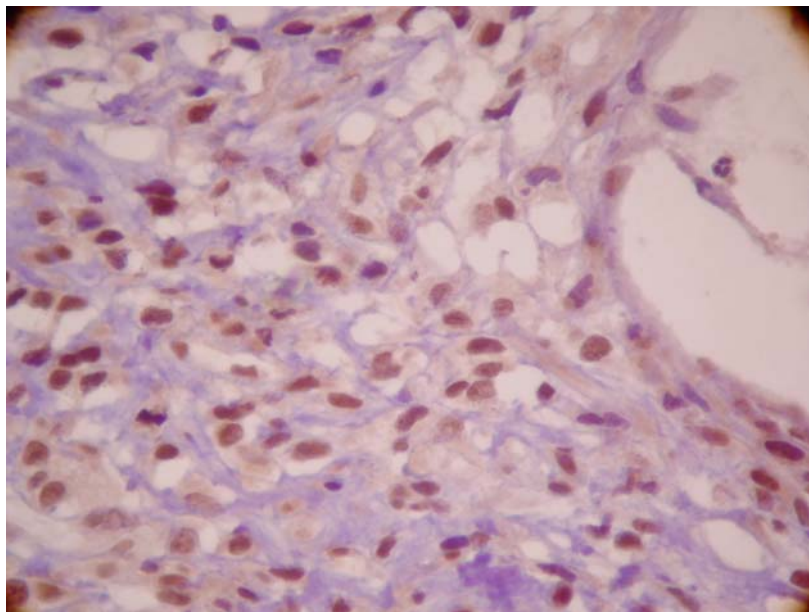
As lâminas foram então incubadas com o complexo - reagente A (Streptavidin) no título pré-estabelecido de 1: 200 e reagente B (Biotinylated peroxydase) no título pré-estabelecido de 1: 200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C para amplificação da reação. Nova lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

A reação foi revelada através da incubação das lâminas em solução substância cromógena de tetrahidrocloro de diaminobenzidina (DAB) 60 mg% (Sigma, D-5637, USA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6% (água oxigenada 20 vol).; 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Nova lavagem em água corrente e água destilada por 3 minutos.

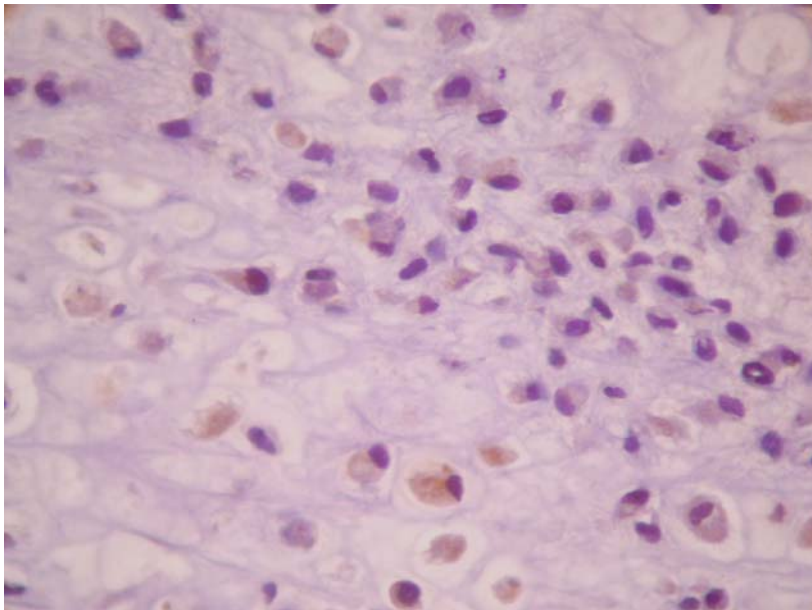
Os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Após nova lavagem em água corrente e destilada, as lâminas foram imersas em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

Na seqüência, as lâminas foram desidratadas com banhos sucessivos de etanol a 80%, 95% e a 100% por 30 segundos cada um, e em quatro banhos de xilol, de 30 segundos cada.

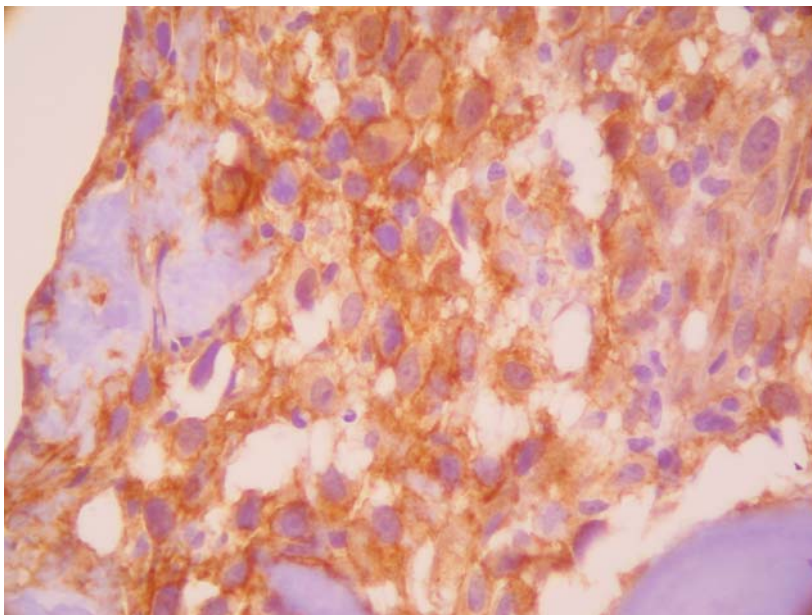
Procedeu-se, então, a montagem das lâminas em polímero (Entellan® neu, MERCK, 1.07961, Germany) (Figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16).



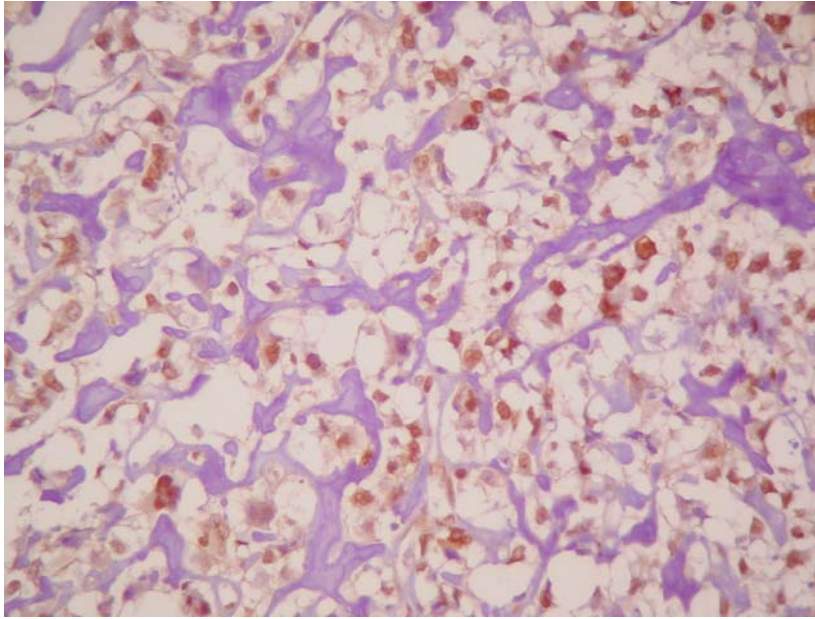
**Figura 10** - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação nuclear pelo APC. Aumento 400x.



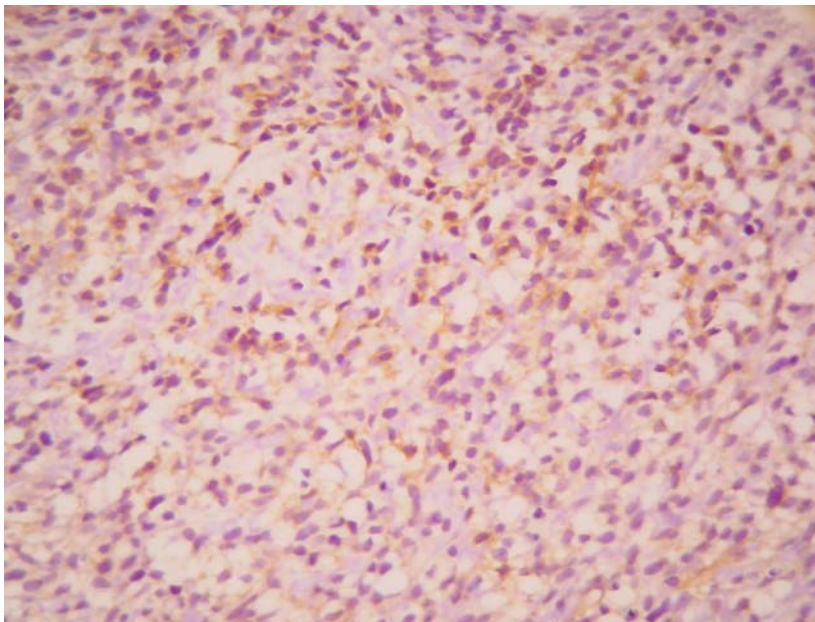
**Figura 11** - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação citoplasmática pelo APC. Aumento 400x.



**Figura 12** - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação citoplasmática pela  $\beta$ -catenina. Aumento 400x.

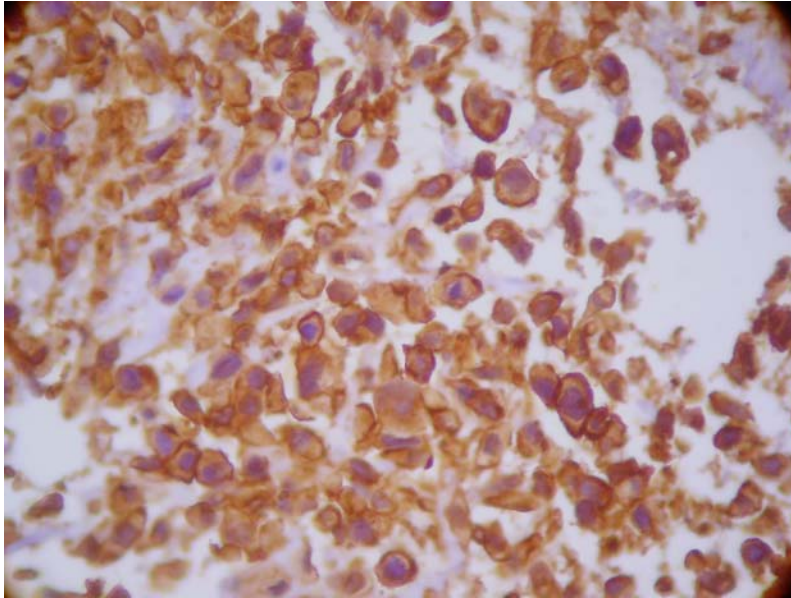


**Figura 13** - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação nuclear pela  $\beta$ -catenina. Aumento 200x.

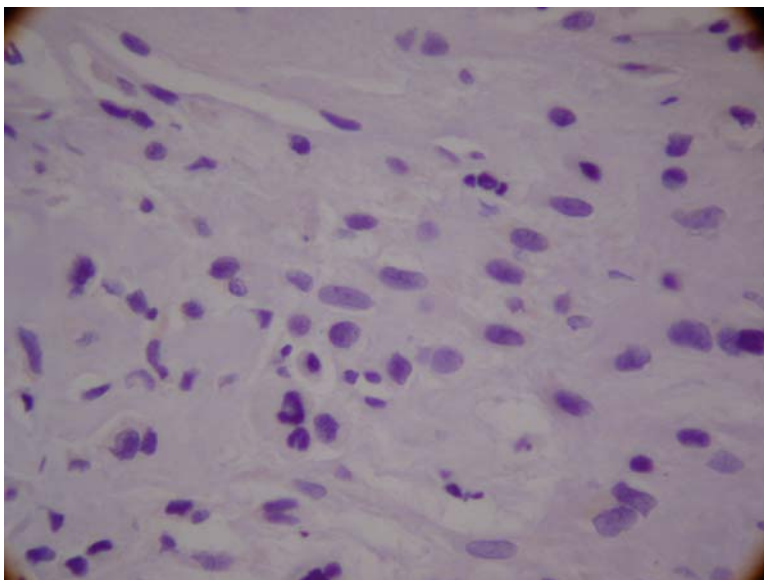


**Figura 14** - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação de membrana pelo c-erbB-2. Aumento 400x.





**Figura 15** - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação de membrana pelo Pan-caderina. Aumento 200x.



**Figura 16** - Fotomicrografia de osteossarcoma convencional de extremidade com marcação negativa pela E-caderina. Aumento 200x.

As reações sempre foram acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para anticorpo anti-APC, anti c-erbB-2, anti Pan-caderina, anti E-caderina e anti- $\beta$ -catenina, e de dois controles negativos. Um dos controles negativos foi obtido pelo não uso do anticorpo primário durante os passos da reação. O segundo controle negativo foi obtido pela supressão do anticorpo secundário.

Na avaliação da reação imunoistoquímica foi empregado o microscópio óptico Zeiss com ocular CFW 10x e objetiva 40 (0.65, 160/ 0,17). A leitura da reação foi feita por dois observadores que fizeram avaliações em separado com a avaliação de positividade ou negatividade da reação (Apresentando índice de concordância de 100%). Nos casos em que a marcação imunoistoquímica apresentou falha ou não foi possível avaliar fragmento representativo do tumor foi considerado não avaliável.

Os resultados imunoistoquímicos foram avaliados da forma tradicional, sendo considerado positivo o depósito acastanhado do DAB. A avaliação foi qualitativa, considerando-se positivas as células que apresentavam coloração acastanhada, com variação de tonalidade no núcleo ou membrana conforme o marcador avaliado.

O c-erbB-2, E-caderina e Pan-caderina foram considerados positivos quando mais de 10% das células tumorais apresentavam marcação forte na membrana citoplasmática. O APC, foi considerado positivo quando havia expressão nuclear ou citoplasmática em mais de 10% das células coradas e a  $\beta$ -catenina, quando havia expressão de membrana, citoplasmática ou nuclear em mais de 10% das células tumorais.

### **4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos dos prontuários foram registradas em uma ficha de levantamento padronizada (Anexo 1) e digitadas e arquivadas em um banco de dados com o auxílio do programa “Excel 7.0 for Windows”. Para a análise estatística utilizou-se o *software for Windows Statistical Package for Social Science (SPSS)*, versão 10.0.

A distribuição das variáveis clínicas, anatomopatológicas e referentes ao tratamento foram apresentadas na forma de tabelas de contingências.

A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelos intervalos, medianas, médias e respectivos desvios padrões. As associações das variáveis quantitativas como a expressão do c-erbB-2, E-caderina, Pan-caderina e  $\beta$ -catenina e presença de metástase foram efetuadas com o teste do qui-quadrado bi-caudal; e sempre que necessário, devido às frequências esperadas inferiores ao valor 5 dentro de uma tabela 2x2, utilizou-se o Teste de Fisher.

O tempo de sobrevida livre de doença foi calculado como o período entre o início do tratamento e a data do diagnóstico do aparecimento da metástase observada. Para a análise da sobrevida livre de doença foram excluídos os casos que apresentavam metástase ao diagnóstico. Os pacientes vivos sem evidência de metástases na data da última informação foram considerados sob censura para a curva de sobrevida pelo método de KAPLAN e MEIER (1958) ou para utilização da regressão de COX (1972).

O tempo de sobrevida global foi calculado como o período entre o início do tratamento e a data da última informação objetiva observada (para os pacientes vivos nesta data) ou a data do óbito por câncer. Os pacientes vivos na data da última informação foram considerados sob censura para a curva de sobrevida pelo método de KAPLAN e MEIER (1958) ou para utilização da regressão de COX (1972).

Pacientes que não compareceram as consultas ou sem informações por um período superior a duas vezes o estipulado para retorno foram considerados perdidos de seguimento na data da última informação. Esses pacientes contribuíram para a curva de sobrevida até tal data, sendo então considerados sob censura.

As sobrevidas livre de doença e sobrevida global, foram feitas pelo estimador produto de limite de KAPLAN e MEIER (1958) e a comparação entre curvas através do teste



de Logrank. Na análise multivariada para sobrevida usou-se o modelo de riscos proporcionais de COX (1972) calculando-se as razões de risco proporcional para óbito.

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para sobrevida livre de doença e sobrevida global, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de  $p$  de até 0,20.

O resultado final para os modelos multivariados, regressão logística e de COX (1972), foi obtido pela estratégia *stepwise forward selection*, (procedimento de adição e eliminação) onde a partir da variável de maior significância na análise univariada as outras foram acrescentadas, uma a uma, em ordem crescente, segundo valor de  $p$ .

Os valores referentes a dados de frequência e taxas de sobrevida foram simplificados com técnicas de arredondamento padronizadas permanecendo apenas uma casa decimal. Segundo a ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) o nível de significância estatística ( $\alpha$ ) para inferência estatística foi estabelecido em 0,05.

## **4.4 CASUÍSTICA**

### **4.4.1 Aspectos demográficos e clínicos**

Nesta série foram avaliados 97 pacientes portadores de osteossarcoma convencional de extremidade com doença metastática ou não ao diagnóstico submetidos a tratamento no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C.Camargo no período de 1985 a 2000.

A idade neste grupo de pacientes variou de 6 a 70 anos com mediana de 16. Sessenta e quatro pacientes (66%) apresentavam idade inferior a 18 anos e 33 (34%) mais de 18 anos.

Setenta e seis pacientes (78,4%) eram brancos e 21 (21,6%) não brancos.

Cinquenta e cinco pacientes eram do sexo masculino (56,7%) e 42 (43,3%) do sexo feminino.

Quanto a localização do tumor primário, 49 pacientes apresentavam tumor com origem no fêmur (50,5%); vinte e sete (27,8%) na tíbia; 16 (16,5%) no úmero; três (3,1%) na fibula e 2 (2,1%) no rádio.

A medida sérica de fosfatase alcalina (FA) foi encontrada em 61 casos (62,9%) e em 36 (37,1%) não havia dados em prontuário. Dos casos avaliáveis, o valor laboratorial variou de 28 a 4696 U/l, com mediana de 230 U/l.

O valor sérico de desidrogenase láctica (DHL) foi encontrado em 51 casos (52,6%) e em 46 casos (47,4%), não havia dados de mensuração. Dos casos avaliáveis, o valor laboratorial variou de 96 a 854 U/l, com mediana de 236 U/l.

De acordo com o estadiamento clínico TNM 1998, 5 pacientes (5,2%) foram estadiados como T1 e 68 (70,1%) como T2. Não foi encontrado referência ao estadiamento T na admissão em 24 casos (24,7%).

Todos os pacientes eram N0 na apresentação inicial. Em relação ao estadiamento M da admissão, 83 pacientes foram considerados como M0 (85,6%) e 14 (14,4%) como M1.

A cirurgia foi utilizada como tratamento em 91 casos, sendo em 62 (63,9%) realizada a cirurgia conservadora e em 29 (29,9%) a amputação. Seis pacientes (6,2%) não foram operados (Tabela 6).

**Tabela 6** - Frequência das variáveis clínicas e demográficas dos 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Variável	Número de Pacientes	%
<b>Idade</b>		
Até 18 anos	64	66
>18 anos	33	34
<b>Raça</b>		
Branca	76	78,4
Não Branca	21	21,6
<b>Sexo</b>		
Masculino	55	56,7
Feminino	42	43,3
<b>Local do tumor primário</b>		
Fêmur	49	50,5
Tíbia	27	27,8
Fíbula	03	3,1
Úmero	16	16,5
Rádio	02	2,1
<b>Nível sérico de desidrogenase láctica (DHL) ao diagnóstico</b>		
Até 236	26	26,8
> 236	25	25,8
Ignorado	46	47,4
<b>Nível sérico de fosfatase alcalina (FA) ao diagnóstico</b>		
Até 230	31	32
> 230	30	30,9
Ignorado	36	37,1
<b>Estadiamento cT</b>		
T1	5	5,2
T2	68	70,1
Ign	24	24,7
<b>Metástase ao diagnóstico</b>		
M0	83	85,6
M1	14	14,4
<b>Cirurgia do tumor primário</b>		
Conservadora	62	63,9
Amputação	29	29,9
Não operado	6	6,2

#### 4.4.2 Aspectos anatomopatológicos

O grau de necrose tumoral (HUVOS) foi avaliado na peça operatória com os respectivos resultados: 10 pacientes (10,3%) como HUVOS I, 39 (40,2%) HUVOS II, 18 (18,6%) HUVOS III e em 11 (11,3%) HUVOS IV. Não havia descrição do grau de necrose

em 13 casos (13,4%) e 6 casos (6,2%) não foram operados. Após análise do grau de necrose de Huvos os pacientes foram estratificados em dois grupos: grupo 1 (HUVOS I e II) e grupo 2 (HUVOS III e IV) considerados maus e bons respondedores a quimioterapia, respectivamente, conforme dados de literatura (RAYMOND et al. 1987; GLASSER et al. 1992) (Tabela 7).

O tipo histológico em 70 casos (72,2%) foi osteoblástico, em 20 (20,6%) condroblástico e em sete (7,2%) fibroblástico. (Tabela 7).

**Tabela 7** - Frequência de variáveis anatomopatológicas do tumor primário dos 97 pacientes portadores de osteossarcomas de extremidades.

Variável	Número de Pacientes	%
<b>Grau de necrose (HUVOS).</b>		
I e II	49	50,5
III e IV	29	29,9
Ign	19	19,6
<b>Tipo Histológico</b>		
Condroblastico	20	20,6
Osteoblastico	70	72,2
Fibroblastico	7	7,2

#### 4.4.3 Aspectos cirúrgicos

Sessenta e dois pacientes (63,9%) foram submetidos à cirurgia conservadora de membros e 29 (29,9%) a amputação. Em seis casos (6,2%) a cirurgia não foi realizada.

Considerando o período antes e após 1990, o número de amputações foi maior no período até 1990. Antes de 1990, em onze pacientes avaliáveis, 3 (27,3%) foram submetidos a cirurgia conservadora, e 8 (72,7 %) à amputação. No período após 1990, dos 80 pacientes avaliáveis, 59 (73,8%) foram submetidos a cirurgia conservadora e 21 (26,3%) à amputação.

Dos 62 pacientes submetidos à cirurgia conservadora, em cinquenta e nove (95,2%) esta ocorreu no período após 1990. (Tabela 8).

**Tabela 8** - Tipo de cirurgia por período em pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Tipo de Cirurgia	Período	
	Até 1990 (%)	Após 1990 (%)
Conservadora	3 (27,3%)	59 (73,8%)
Amputação	8 (72,7%)	21 (26,3%)
Total	11 (100%)	80 (100%)

#### 4.5 TIPOS DE QUIMIOTERAPIA

Dos 97 pacientes, 86 foram submetidos à quimioterapia pré-operatória, oito (8,2%) eram do grupo 1, dois (2,1%) eram do grupo 2, quarenta e dois (43,3%) do grupo 3, treze (13,4%) do grupo 4, cinco casos (5,2%) do grupo 5, seis (6,2%) do grupo 6 e dez (10,3%) eram do grupo 7. Onze casos (11,3%) não realizaram quimioterapia pré-operatória (Figura 17).

**Figura 17** - Frequência dos tipos de quimioterapia pré-operatória (%)

Dos 86 casos avaliáveis quanto ao número de quimioterapia realizadas no pré-operatória, este variou de 1 a 7 ciclos, com média de 3,9 (dp= 1,5) e mediana de 4 ciclos.

Dos 97 pacientes, 76 realizaram quimioterapia pós-operatória. Seis (6,2%) eram do grupo 1, um caso (1,0%) do grupo 2, quarenta e um (42,3%) do grupo 3, treze (13,4%) do grupo 4, dois casos (2,1%) do grupo 5, quatro (4,1%) do grupo 6 e nove (9,3%) eram do grupo 7. Vinte e um casos (21,6%) não realizaram quimioterapia pós-operatória (Figura 18).

**Figura 18** - Frequência dos tipos de quimioterapia pós-operatória (%).

Dos 76 casos avaliáveis quanto ao número de quimioterapia realizadas no pós-operatória, este variou de 1 a 12 ciclos, com média de 4,6 (dp= 2,0) e mediana de 4 ciclos.

Onze pacientes não foram submetidos à quimioterapia pré-operatória, 21 não realizaram quimioterapia pós-operatória e sete pacientes não realizaram quimioterapia pré ou pós-operatória. Em virtude da heterogeneidade dos esquemas de quimioterapia e da ausência de diferença entre resposta a quimioterapia baseada no grau de necrose de HUVOS e de sobrevida entre estes (dados não demonstrados), optamos por estratificar tanto a quimioterapia pré-operatória quanto pós-operatória em dois grupos: 0- não submetidos a quimioterapia e 1-submetidos a quimioterapia.

#### **4.6 SEGUIMENTO**

O tempo de seguimento variou de 2,14 a 217,9 meses com mediana de 44,7 meses.

Dos 97 pacientes, 56 (57,7%) apresentaram metástases, sendo em 14 pacientes (14,4%) ao diagnóstico e em 42 pacientes (43,3%) ao seguimento. O intervalo livre de metástase (medindo como o intervalo entre o diagnóstico e o aparecimento da metástase) nos casos que desenvolveram metástase ao seguimento variou de 3,19 a 62,4 meses, com média de 20,6 meses (dp = 14,8) e mediana de 15,6 meses. Sendo que 32 destes casos (76,2%) a metástase ocorreu em até 24 meses.

Dos 56 casos metastáticos (57,7%), a metástase ocorreu exclusivamente no pulmão em 38 casos (39,2%), em 14 (14,4%) no pulmão e em outros órgãos concomitantemente, e em 4 casos (4,1%) exclusivamente em outros órgãos que não pulmão. O segundo órgão mais acometido por metástase foi o osso com 8 casos (14,2%).

Ao final do seguimento, 31 (32%) pacientes estavam vivos sem doença, 44 (45,4%) morreram em decorrência do câncer. Um paciente (1%) faleceu por outra causa e 21 (21,6%) foram perdidos de seguimento (Tabela 9). Sendo que o paciente falecido por outra causa na realidade faleceu por suicídio com doença metastática em atividade e fora de possibilidades terapêuticas. Dentre os perdidos de seguimento, 15 casos dos 21 (71,4%) ocorreram após 2 anos. Após 5 anos 8 casos foram perdidos de vista, sendo que 7 destes estavam livres de doença ao momento da última informação.

**Tabela 9** - Situação clínica dos 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades ao final da atualização dos dados.

Situação Clínica	N	%
Vivos sem doença	31	32
Morte por câncer	44	45,4
Óbito por outra causa	1	1
Perdidos de seguimento	21	21,6

Seguimento (meses): média de 58,5 (dp=46,9) e mediana de 44,7 (2,14 a 217,9).

## ***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 a introdução de qualquer modificação terapêutica, ou aplicação de qualquer medicação ou método que possa gerar danos, benefícios, ou outras conseqüências a qualquer paciente.

Desta forma, não foi necessária a adoção de consentimento pós-informado.

Foram utilizados dados de prontuários e material arquivado em blocos de parafina no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer.

O uso do material parafinado não acarretou prejuízo aos pacientes, pois a terapêutica julgada necessária para os mesmos já havia sido instituída.

O projeto foi avaliado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital do Câncer e foi aprovado em 27/06/2000. Está protocolado na referida comissão sob o número 252/00.

## ***RESULTADOS***

---

## 6 RESULTADOS

### 6.1 REAÇÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

#### 6.1.1 Imunoistoquímica do c-erbB-2

A imunorreatividade de membrana do c-erbB-2 foi negativa em 78 (80,4%) e positiva em 16 (16,5%) e não avaliável em 3 (3,1%). Não houve associação entre os índices de imunorreatividade do c-erbB-2 com as variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas (Tabela 10).

**Tabela 10** - Imunorreatividade do c-erbB-2 segundo as variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas em pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Variável	Categoria	c-erbB-2 (-).* n (%)	c-erbB-2 (+).* n (%)	p
Idade	Até 18 anos	52(83,9).	10(16,1).	0,749
	Mais que 18 anos	26(81,3).	6(18,8).	
Raça	Branca	60(81,1).	14(18,9).	0,508
	Não Branca	18(90,0).	2(10,0).	
Sexo	Masculino	42(79,2).	11(20,8).	0,273
	Feminino	36(87,8).	5(12,2).	
Níveis séricos de DHL*	Até 236	17(68,0).	8(32,0).	0,119
	Maior que 236	20(87,0).	3(13,0).	
Níveis séricos de FA*	Até 230	22(73,3).	8(26,7).	0,421
	Maior que 230	23(82,1).	5(17,9).	
Estadiamento cT*	T1	4(80,0).	1(20,0).	1,000
	T2	52(78,8).	14(21,2).	
Metástase ao diagnóstico	M negativo	66(81,5).	15(18,5).	0,456
	M positivo	12(92,3).	1(7,7).	
Metástases**	Negativo	43(81,1).	10(18,9).	0,588
	Positivo	35(85,4).	6(14,6).	
Grau de necrose (HUVOS)*.	I e II	40(83,3).	8(16,7).	1,000
	III e IV	25(86,2).	4(13,8).	
Tipo Histológico	Osteoblástico	55(80,9).	13(19,1).	0,543
	Não Osteoblástico	23(88,5).	3(11,5).	

\*Excluídos os casos sem informação ou com c-erbB-2 não avaliável: DHL- 49 casos, FA- 39 casos, cT- 26 casos, Grau de necrose de Huvos- 20 casos, respectivamente.

\*\*Metástases em qualquer momento.

### 6.1.2 Imunoistoquímica da E-Caderina

A marcação imunoistoquímica da E-caderina foi negativa em todos os casos.

### 6.1.3 Imunoistoquímica da Pan-Caderina

A imunorreatividade de membrana da Pan-caderina foi negativa em 3 casos (3,1%) e positiva em 94 (96,9%) Não houve associação entre os índices de imunorreatividade da Pan-caderina com as variáveis clínicas e demográficas e com as anatomopatológicas (Tabela 11).

**Tabela 11** - Imunorreatividade da Pan-caderina segundo as variáveis clínico- demográficas e anatomopatológicas em pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Variável	Categoria	Pan-caderina (-).* n (%)	Pan-caderina (+).* n (%)	p
Idade	Até 18 anos	1(1,6).	63(98,4).	0,266
	Mais que 18 anos	2(6,1).	31(93,3).	
Raça	Branca	3(3,9).	73(96,1).	1,000
	Não Branca	0(0,0).	21(100,0).	
Sexo	Masculino	1(1,8).	54(98,2).	0,577
	Feminino	2(4,8).	40(95,2).	
Níveis séricos de DHL*	Até 236	0(0,0).	26(100,0).	0,490
	Maior que 236	1(4,0).	24(96,0).	
Níveis séricos de FA*	Até 230	1(3,2).	30(96,8).	1,000
	Maior que 230	1(3,3).	29(96,7).	
Estadiamento cT*	T1	0(0,0).	5(100,0).	1,000
	T2	3(4,4).	65(95,6).	
Metástase ao diagnóstico	M negativo	2(2,4).	81(97,6).	0,377
	M positivo	1(7,1).	13(92,9).	
Metástases**	Negativo	1(2,4).	40(97,6).	1,000
	Positivo	2(3,6).	54(96,4).	
Grau de necrose (HUVOS)*.	I e II	2(4,1).	47(95,9).	0,527
	III e IV	0(0,0).	29(100,0).	
Tipo Histológico	Osteoblástico	3(4,3).	67(95,7)	0,558
	Não Osteoblástico	0(0,0).	27(100,0)	

\*Excluídos os casos sem informação: DHL- 46 casos, FA- 36 casos, cT- 24 casos , Grau de necrose de Huvos-19 casos respectivamente.

\*\* Metástase em qualquer momento.

#### 6.1.4 Imunoistoquímica do APC

A imunorreatividade do APC foi negativa em 28 casos (28,9%), positiva em 65 (67%) e em 4 (4,1%) não foi avaliável. Não houve associação entre os índices de imunorreatividade do APC com as variáveis clínicas e demográficas exceto a idade que mostrou associação estatisticamente significativa ( $p=0,025$ ). Não houve associação entre os índices de imunorreatividade do APC com as variáveis anatomopatológicas (Tabela 12).

**Tabela 12** - Imunorreatividade do APC segundo as variáveis clínicas e demográficas e anatomopatológicas em pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Variável	Categoria	APC (-).* n (%)	APC (+).* n (%)	p
Idade	Até 18 anos	14(22,6).	48(77,4).	0,025
	Mais que 18 anos	14(45,2).	17(54,8).	
Raça	Branca	22(29,7).	52(70,3).	0,875
	Não Branca	6(31,6).	13(68,4).	
Sexo	Masculino	17(32,7).	35(67,3).	0,650
	Feminino	11(26,8).	30(73,2).	
Níveis séricos de DHL*	Até 236	7(28,0).	18(72,0).	0,882
	Maior que 236	6(26,1).	17(73,9).	
Níveis séricos de FA*	Até 230	9(30,0).	21(70,0).	0,733
	Maior que 230	7(25,9).	20(74,1).	
Estadiamento cT*	T1	2(40,0).	3(60,0).	0,646
	T2	20(30,8).	45(69,2).	
Metástase ao diagnóstico	M negativo	27(33,8).	53(66,3).	0,099
	M positivo	1(7,7).	12(92,3).	
Metástases**	Negativo	12(29,3).	29(70,7).	0,876
	Positivo	16(30,8).	36(69,2).	
Grau de necrose (HUVOS)*.	I e II	15(31,3).	33(68,8).	0,806
	III e IV	8(28,6).	20(71,4).	
Tipo Histológico	Osteoblástico	20(29,9)	47(70,1)	0,931
	Não Osteoblástico	8(30,8)	18(69,2)	

\*Excluídos os casos sem informação ou com APC não avaliável: DHL- 49 casos, FA- 40 casos, cT- 27 casos, Grau de necrose de Huvos- 21 casos respectivamente

\*\* Metástase em qualquer momento.

### 6.1.5 Imunoistoquímica da $\beta$ -Catenina

A imunorreatividade da  $\beta$ -catenina foi negativa em 87 casos (89,7%) e positiva em 3 (3,1%) e em 7(7,2%) não foi avaliável. Não houve associação entre os índices de imunorreatividade da  $\beta$ -catenina com as variáveis clínicas e demográficas e anatomopatológicas (Tabela 13).

**Tabela 13** - Imunorreatividade da  $\beta$ -catenina segundo as variáveis clínicas e demográficas e anatomopatológicas em pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Variável	Categoria	$\beta$ -catenina (-).* n (%)	$\beta$ -catenina (+).* n (%)	p
Idade	Até 18 anos	59(96,7).	2(3,3).	1,000
	Mais que 18 anos	28(96,6).	1(3,4).	
Raça	Branca	68(95,8).	3(4,2).	1,000
	Não Branca	19(100,0).	0(0,0).	
Sexo	Masculino	50(96,2).	2(3,8).	1,000
	Feminino	37(97,4).	1(2,6).	
Níveis séricos de DHL*	Até 236	22(91,7).	2(8,3).	0,489
	Maior que 236	23(100,0).	0(0,0).	
Níveis séricos de FA*	Até 230	27(96,4).	1(3,6).	0,611
	Maior que 230	25(92,6).	2(7,4).	
Estadiamento cT*	T1	5(100,0).	0(0,0).	1,000
	T2	61(96,8).	2(3,2).	
Metástase ao diagnóstico	M negativo	75(97,4).	2(2,6).	0,377
	M positivo	12(92,3).	1(7,7).	
Metástases**	Negativo	36(94,7).	2(5,3).	0,571
	Positivo	51(98,1).	1(1,9).	
Grau de necrose* (HUVOS)	I e II	43(93,5).	3(6,5).	0,285
	III e IV	28(100,0).	0(0,0).	
Tipo Histológico	Osteoblástico	63(95,5)	3(4,5)	0,562
	Não	24(100,0)	0(0,0)	
	Osteoblástico			

\*Excluídos os casos sem informação ou com  $\beta$ -catenina não avaliável: DHL- 50 casos, FA- 42 casos, cT- 29 casos, Grau de necrose de Huvos- 23 casos, respectivamente

\*\* Metástase em qualquer momento.

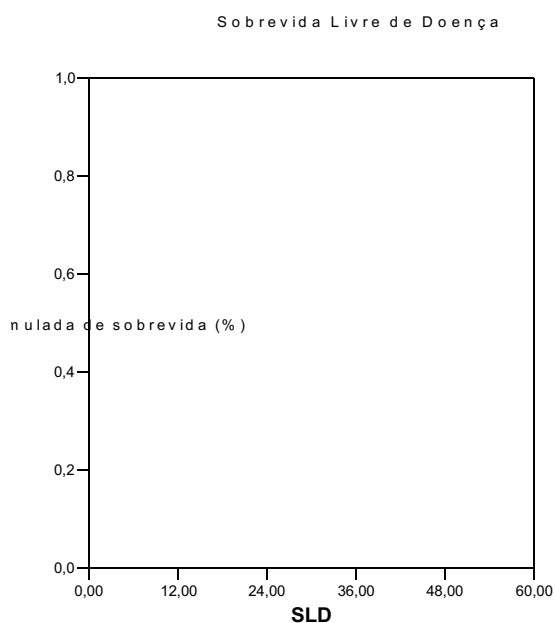
## 6.2 ANÁLISE DE SOBREVIDA

### 6.2.1 Sobrevida Livre de Doença (SLD)

#### 6.2.1.1 Análise univariada

Para a análise da sobrevida livre de doença foram excluídos os casos que apresentavam metástase ao diagnóstico.

Em 83 casos livre de metástase ao diagnóstico, o seguimento livre de doença variou de 2,3 a 178,6 meses, com média de 48,4 (dp= 41,8) e mediana de 32,4 meses. A sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos da população estudada foi de 49,0% (Figura 19).



**Figura 19** - Curva de sobrevida livre de doença para os 83 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades sem metástases ao diagnóstico.

Das variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas avaliadas, apenas a raça ( $p=0,028$ ) influenciou significativamente na sobrevida livre de doença (SLD) (Tabela 14).

**Tabela 14** - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos de acordo com variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas em 83 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades sem metástases ao diagnóstico.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	p(log rank).
Idade	Até 18 anos	53	45,9	0,772
	> 18 anos	30	55,2	
Raça	Branca	65	56,1	0,028**
	Não Branca	18	23,7	
Sexo	Masculino	46	44,4	0,567
	Feminino	37	54,7	
Nível sérico de DHL*	Até 236	23	45,0	0,802
	> 236	20	52,6	
Nível sérico de FA*	Até 230	28	51,7	0,402
	>230	24	41,7	
Estadiamento cT*	T1	5	75,0	0,338
	T2	58	49,9	
Grau de necrose de* HUVOS	I e II	43	50,9	0,572
	III e IV	26	61,2	
Tipo Histológico	Osteoblástico	23	58,3	0,325
	Não Osteoblástico	60	45,3	

\*Excluídos os casos sem informação.

\*\* Variáveis selecionadas para a regressão de COX

Dentre as variáveis relacionadas ao tratamento o período de realização da cirurgia apresentou associação estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) e o tipo de cirurgia ficou próximo da significância ( $p = 0,070$ ). Dos marcadores imunoistoquímicos apenas a imunorreatividade da Pan-Caderina apresentou significância estatística ( $p < 0,001$ ) para a sobrevida livre de doença, apesar da pequena casuística e do seguimento curto (máximo de 4,6 meses). As demais variáveis não apresentaram significância estatística para a sobrevida livre de doença (SLD) (Tabela 15).



**Tabela 15** – Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos segundo variáveis relacionadas ao tratamento e imunoistoquímicas em 83 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades livres de metástase ao diagnóstico.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida livre de doença em 5 anos (%)	p(logrank).
Qt pré-operatória	Não	8	37,5	0,360
	Sim	75	56,4	
Qt pós-operatória	Não	16	56,9	0,877
	Sim	67	47,7	
Tipo de cirurgia*	Conservadora	57	55,4	0,070**
	Amputação	23	32,2	
Período*	1985-1990	10	11,1	<0,001**
	1991-2000	70	53,9	
c-erbB-2*	Negativo	66	53,3	0,091
	Positivo	15	38,9	
Pan-Caderina	Negativo	2	#	<0,001**
	Positivo	81	49,6	
APC*	Negativo	27	40,4	0,150**
	Positivo	53	56,4	
$\beta$ -catenina*	Negativo	75	48,3	0,244
	Positivo	2	100,0	

\*Excluídos os casos sem informação, não operados e não avaliáveis do c-erbB-2/ APC/  $\beta$ -catenina.

\*\* Variáveis selecionadas para a regressão de COX.

# Seguimento máximo de 4,6 meses

## 1. Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para sobrevida livre de doença, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 (Tabela 16).

**Tabela 16** - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para sobrevida livre de doença. Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

Variável	P
Pan-Caderina	<0,001
Período	<0,001
Raça	0,028
Tipo cirurgia	0,07
APC	0,150

No modelo multivariado com as variáveis selecionadas, a Pan-Caderina foi fator independente para a sobrevida livre de doença, HR = 32,6; IC 95% [1,9 – 554,8] bem como Período da cirurgia HR=3,3; IC 95% [ 1,4-7,7 ] e raça HR=2,1;IC 95% [1,1-4,1] (Tabela 17).

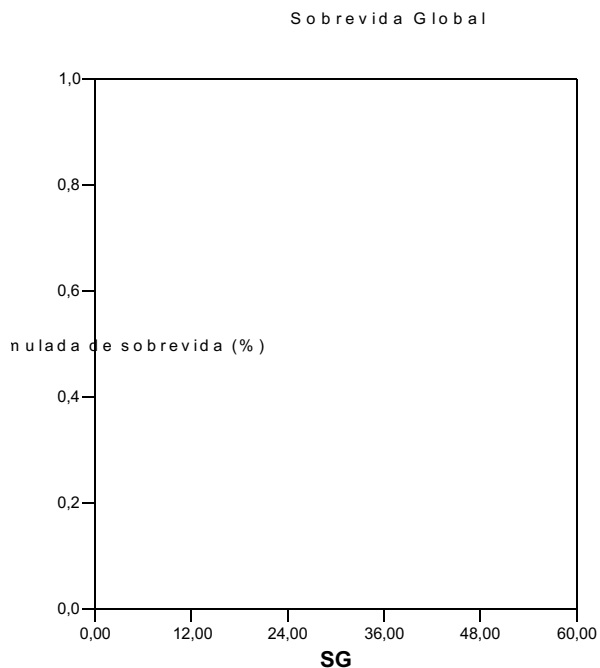
**Tabela 17** – Sobrevida livre de doença em 83 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	HR	IC 95%	P
Pan-caderina	Negativo	32,6	1,9 – 554,8	0,016
	Positivo	1	Ref.	
Período	Até 1990	3,3	1,4 – 7,7	0,004
	Após 1990	1	Ref.	
Raça	Não Branca	2,1	1,1-4,1	0,037
	Branca	1	Ref.	

### 6.3. SOBREVIDA GLOBAL (SG).

#### 6.3.1 Análise univariada

A taxa de sobrevida global (SG) em 5 anos da população estudada (97casos) foi de 55,25%, como mostrado na Figura 20.



**Figura 20** - Curva de sobrevida global para os 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

A sobrevida global (SG) em 5 anos nos 56 casos metastáticos foi de 28,46% quando avaliados após o diagnóstico da metástase. Sendo respectivamente de 26,8% para os 14 casos metastáticos ao diagnóstico e de 29,2% para os 42 casos que desenvolveram metástase ao seguimento. O tempo de seguimento dos 14 casos metastáticos ao diagnóstico variou de 2,6 a 217,9 meses, com mediana de 22 meses. E o tempo de seguimento nos 42 casos metastáticos ao seguimento variou de 2,1 a 155 meses, com mediana de 26,3 meses.

No grupo que desenvolveu metástase ao seguimento o tempo para desenvolvimento desta variou de 3,19 a 62,43 meses, com mediana de 15,6 meses, sendo que em 34 casos (80,9%) a metástase ocorreu nos primeiros dois anos e em dois casos apenas no quinto ano.

Dentre as variáveis clínicas e demográficas e anatomopatológicas nenhuma apresentou associação estatisticamente significativa com a sobrevida global (Tabela 18).

**Tabela 18** - Probabilidade acumulada de sobrevida global (SG) em 5 anos de acordo com variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida global em 5 anos (%)	p(log rank).
Idade	Até 18 anos	64	55,6	0,728
	> 18 anos	33	56,3	
Raça	Branca	76	56,9	0,467
	Não Branca	21	48,7	
Sexo	Masculino	55	56,9	0,810
	Feminino	42	53,1	
Nível sérico de DHL*	Até 236	26	56,5	0,667
	> 236	25	59,7	
Nível sérico de FA*	Até 230	31	63,7	0,388
	>230	30	53,1	
Estadiamento cT*	T1	5	75,0	0,399
	T2	68	57,9	
Grau de necrose de HUVOS*	I e II	49	56,8	0,471
	III e IV	29	64,0	
Tipo Histológico	Osteoblastico	27	65,8	0,241
	Não Osteoblastico	70	51,6	

\*Excluídos os casos sem informação.

Dos marcadores imunoistoquímicos a imunorreatividade do c-erbB-2 e da  $\beta$ -catenina não apresentaram significância estatística para a sobrevida global (SG). Já a imunorreatividade do APC ficou próximo da significância estatística ( $p=0,051$ ) e a imunorreatividade da Pan-Caderina apresentou significância estatística ( $p<0,001$ ) para a sobrevida global. (Tabela 19).

**Tabela 19** - Probabilidade acumulada de sobrevida global (SG) em 5 anos de acordo com a imunorreatividade de c-erbB-2, Pan-Caderina e APC e  $\beta$ -catenina em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida global em 5 anos (%)	p(log rank).
c-erbB-2	Negativo	78	53,7	0,445
	Positivo	16	63,5	
Pan-Caderina	Negativo	3	0,0	<0,001**
	Positivo	94	57,0	
APC	Negativo	28	36,9	0,051**
	Positivo	65	63,2	
B-catenina	Negativo	87	54,1	0,177**
	Positivo	3	100,0	

\*Excluídos os casos sem informação.

\*\* Variáveis selecionadas para regressão de COX.

A realização de quimioterapia pós-operatória apresentou significância estatística ( $p=0,023$ ). As demais variáveis não influenciaram significativamente a sobrevida global (SG) (Tabela 20).

**Tabela 20** – Probabilidade acumulada de sobrevida global (SG) em 5 anos de acordo com variáveis relacionadas ao tratamento em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Variável	Categoria	N*	Sobrevida global em 5 anos (%)	p(logrank).
Qt pré-operatória	Não	10	46,7	0,239
	Sim	87	56,3	
Qt pós-operatória	Não	20	39,3	0,023**
	Sim	77	59,2	
Tipo de cirurgia*	Conservadora	62	60,8	0,194**
	Amputação	29	50,1	
Período*	1985-1990	11	45,4	0,711
	1991-2000	80	57,2	

\*Excluídos os casos sem informação.

\*\* Variáveis selecionadas para a regressão de COX.

### 6.3.2 Análise multivariada

As variáveis que atingiram significância estatística na análise univariada para sobrevida global, foram selecionadas para a análise multivariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20 (Tabela 21).

**Tabela 21** - Lista das variáveis por ordem de entrada na análise multivariada para sobrevida global. Considerado como habilitadas para análise aquelas com p até 0,20.

Variável	P
Pan-Caderina	<0,001
Quimioterapia pós-operatória	0,023
APC	0,051
Tipo de cirurgia	0,194
B –catenina	0,177

Durante a análise do modelo multivariado para a sobrevida global foi observado que ambas as variáveis (APC e quimioterapia pós-operatória) quando incorporadas conjuntamente ao modelo foram eliminadas, sugerindo uma interação entre as mesmas. Desta forma, foi então realizada a análise da interação entre APC e quimioterapia pós-operatória.

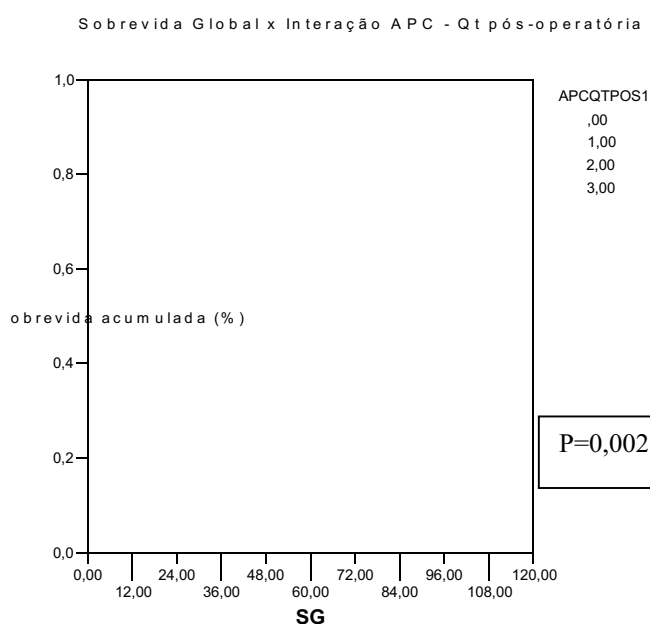
### 6.4 Interação da Imunorreatividade do APC com Quimioterapia pós-operatória

Ao se realizar a interação das variáveis: imunorreatividade do APC e quimioterapia operatória podemos observar diferentes sobrevidas, dependendo basicamente da imunorreatividade do APC.

Foram estratificados em quatro grupos conforme tabela 22

**Tabela 22** – Definição de grupos da interação imunorreatividade do APC com Quimioterapia pós-operatória e sobrevida global em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Grupo	Imunorreatividade do APC	Qt pós-operatória	Nº de Casos	Sobrevida Global (5 anos)
Grupo 0	Negativo	Negativo	7	42,8
Grupo1	Positivo	Negativo	21	38,1
Grupo 2	Negativo	Positivo	13	34,0
Grupo3	Positivo	Positivo	52	69,9



**Figura 21** - Curva de sobrevida global para os grupos da interação imunorreatividade do APC com Quimioterapia pós-operatória nos 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades.

Quando se realizou o modelo multivariado com as variáveis selecionadas, a imunorreatividade da Pan-Caderina (HR = 0,028; IC 95% [0,005 – 0,148]), bem como a interação imunorreatividade do APC com quimioterapia pós-operatória (HR = 0,438; IC 95% [0,230 – 0,833]), ambos foram fatores preditivos para a sobrevida global (Tabela 23).

**Tabela 23** – Sobrevida global em 97 pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades. Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

<b>Variável</b>	<b>Categoria</b>	<b>HR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
Pan-Caderina	Negativa	1	Ref.	<0,001
	Positiva	0,028	0,005-0,148	
Interação APC / Qt pós operatória	Negativo	1	Ref.	0,012
	Positivo	0,438	0,230-0,833	



## ***DISCUSSÃO***

---

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 ASPECTOS GERAIS

Como os fatores anatomopatológicos tradicionais e clínicos são em geral insuficientes para prever evolução e resposta terapêutica tumoral, atualmente vários estudos vem sendo realizados utilizando técnicas imunoistoquímicas e moleculares, em busca de novos marcadores prognósticos e objetivando melhores resultados terapêuticos para esta patologia. A literatura ainda é escassa, sobre o papel das moléculas de adesão celular e da via de sinalização celular WNT (APC) em osteossarcoma. Os objetivos deste estudo foram analisar o padrão da expressão de marcadores imunoistoquímicos neste tumor, correlacionar com dados clínicos e de tratamento, identificar fatores prognósticos e correlacionar com sobrevida.

Sabemos que tumores primários do sistema esqueléticos 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 (RECH et al. 2004), pode acometer todos os grupos etários, mas geralmente tem distribuição bimodal, 75% ocorre em pacientes mais jovens que 20 anos e um pequeno número em idosos. (ROSEMBERG 2005).

Nesta série a mediana de idade foi de 16 anos, sendo que 66% apresentavam idade inferior a 18 anos. Dados semelhantes foram relatados por CZERNIAK (1998) em que 05% dos casos de osteossarcoma ocorrem em pacientes na primeira década e a maioria (60%) entre 10 e 20 anos de idade.

O sexo masculino (56,7%) foi o mais acometido numa proporção de 1,3:1. O predomínio da incidência do sexo masculino é atribuído na maioria dos estudos ao maior período de crescimento esquelético (CZERNIAK, 1998) e geralmente esta proporção varia

de 1,3:1 a 1,6:1 em relação as mulheres (TANAKA et al. 1997; CZERNIAK 1998; ROSEMBERG 2005).

Em relação a raça a experiência relatada pelo Memorial Sloan Kettering, é de menor sobrevida livre de doença e global e pior evolução para a raça negra em relação a branca devido a pior resposta histológica a quimioterapia. Em nossa análise a raça branca foi predominante com 76 casos (78,4%) e 21 casos (21,6%) de não brancos. Não houve correlação entre a raça e as demais variáveis como tamanho tumoral, tipo histológico e grau de necrose (dados não demonstrados). Apesar disto a raça foi considerada uma variável significativa para sobrevida livre de doença na análise uni e multivariada.

A distribuição por localização do tumor primário em osteossarcomas convencionais geralmente corresponde a 35% em fêmur distal, 17% em tíbia proximal, 10% em úmero proximal e a região metafisária é a mais acometida em 90% dos casos (MIRRA et al. 1989; MEYERS 2004). Nesta série, fêmur também foi o sítio anatômico mais acometido com 49 pacientes (50,5%), seguido por tíbia com 27 casos (27,8%), úmero com 16 casos (16,5%), e rádio com 03 casos (3,1%). Tivemos maior acometimento de tumores na região do joelho e úmero como esperado na literatura, outro fator é que trata-se de uma amostra selecionada que exclui localizações outras, como crânio e esqueleto axial.

Alguns marcadores séricos são considerados prognósticos em osteossarcoma. A medida sérica de fosfatase alcalina e desidrogenase láctica (DHL) é geralmente associada a doença avançada ou metastática (BACCI et al. 2002; RECH et al. 2004) e a aumento do risco de recidiva e morte (MEYERS et al. 1992). Em nosso estudo encontramos níveis de fosfatase alcalina variando de 28 a 4696 U/l com mediana de 230 U/l, e de DHL variando de 96 a 854 U/l com mediana de 236 U/l. Como os níveis séricos de DHL e FA foram avaliados ao diagnóstico, níveis acima da mediana foram encontrados respectivamente em 62,5% e 66,7% dos pacientes com doença metastática ao diagnóstico evidenciando correlação dos altos níveis séricos com doença avançada. Apesar disto os níveis acima da mediana tanto de

fosfatase alcalina quanto DHL não apresentaram correlação com a sobrevida livre de doença e global.

O tamanho tumoral também é considerado na maioria dos estudos um fator prognóstico importante. Os tumores volumosos representam um fator negativo de responsividade a quimioterapia e recidiva, isto é atribuído ao aparecimento de clones resistentes (SMELAND et al. 2003). PETRILLI et al. (1991a) encontraram em suas amostra menor sobrevida em pacientes com tumores maiores que 15 cm de diâmetro, com aumento do risco de morte em 3 a 4 vezes. Nesta amostra o dado do estágio clínico cT, conforme TNM (SOBIN e WITTEKIND 1998) foi avaliável ao diagnóstico em 73 pacientes, sendo em 68 pacientes (70%) T2 (tumores com invasão da cortical) ou seja tumores localmente avançados. Não observamos correlação entre o grau de necrose tumoral e o estágio clínico tumoral. Quando avaliamos o tipo de cirurgia em relação ao estágio TNM principalmente M (metástase ao diagnóstico) (SOBIN e WITTEKIND 1998) não observamos diferença estatística. Não houve amputação em pacientes portadores de T1 e houve uma tendência a maior preservação em pacientes com doença não metastática ao diagnóstico (dados não demonstrados).

A cirurgia conservadora foi realizada em 62 casos (63,9%), sendo 03 (27,3%) antes de 1990 e 59 (73,8%) após 1990. No período antes de 1990 dos 11 casos analisados, 8 (72,7%) foram submetidos a amputação. Estes dados são interessantes e compatíveis com os dados históricos desta instituição em análise apesar da pequena casuística antes de 1990. Historicamente o tratamento do osteossarcoma divide-se em antes e após 1970. Antes de 1970 o tratamento do osteossarcoma consistia basicamente da cirurgia e geralmente amputação, e 80 a 90% dos pacientes evoluíam com metástase pulmonar em curto período. Após 1970 com o advento da quimioterapia adjuvante as taxas de cura desta neoplasia aumentaram de 10 a 15% para 60 a 70%, além do aumento das cirurgias conservadoras (BACCI et al. 2002). Nesta série o período da cirurgia ( $p < 0,001$ ) foi importante na análise

univariada e multivariada para a sobrevida livre de doença e o tipo de cirurgia ficou próximo a significância estatística na análise univariada ( $p=0,07$ ) para a sobrevida livre de doença, mas não se mostrou uma variável independente na análise multivariada, estes dados devem estar relacionados a limitação de diagnóstico.

Nesta série houve maior número de amputações no período antes de 1990 possivelmente por problemas de ordem sócio-econômica, maior dificuldade de acesso aos serviços de saúde e conseqüentemente diagnóstico de tumores localmente avançados e com condições locais precárias que inviabilizavam a cirurgia conservadora. Outro fator que pode ter contribuído para a diminuição de amputações após 1990, seria a mudança de abordagem terapêutica em relação ao tumor primário, disponibilidade após esta época em nosso meio de endopróteses, associada a novas tecnologias que permitiam a cirurgia conservadora.

O prognóstico do osteossarcoma de alto grau de extremidade é determinado pelo controle local do tumor primário e pelo desenvolvimento de metástases à distância. Antes de 1970 a taxa de cura era de menos de 15% apenas com a cirurgia. Atualmente com a combinação de quimioterapia e cirurgia houve um melhora importante no prognóstico com taxa de cura maior que 50%, porém pacientes com metástase ao diagnóstico o prognóstico permanece pobre com não mais que 15 a 20% de cura (BACCI et al. 2002). Nesta série apresentamos 14 casos com doença metastática ao diagnóstico (14,4%). Este grupo apresentou uma sobrevida global de 26,8% em 5 anos.

Metástase ao diagnóstico é considerado um fator prognóstico adverso, principalmente quando comparado com pacientes que desenvolveram metástase após seis meses. (ROSSI et al. 1995). Nesta análise o tempo mediano para diagnóstico de metástase ao seguimento foi de 15,6 meses, sendo que em 80,4% esta ocorreu nos primeiros 02 anos. A sobrevida do grupo que desenvolveu metástase ao seguimento foi semelhante ao grupo com doença metastática ao diagnóstico (23,9% x 29,8% em 5 anos) quando esta foi avaliada após o diagnóstico da metástase.

Dentre os fatores anatomopatológicos mais importantes na avaliação prognóstica do osteossarcoma de extremidade está a resposta histológica ou o grau de necrose induzido pela quimioterapia que é considerado como fator preditivo de sobrevida livre de doença (BACCI et al. 1998 b). Este grau de necrose na maioria das séries esta relacionado a menor probabilidade de ter metástases, recorrência local ou ambos (BACCI et al. 2001a). Nesta amostra o grau de necrose foi avaliado baseado na classificação de Huvos e os pacientes foram divididos em dois grupos grau I e II e grau III e IV baseado na Experiência do Memorial Sloan Kettering em respectivamente maus e bons respondedores a quimioterapia. Obtivemos 78 casos avaliáveis, 49 casos (50,5%) de grau I e II e 29 casos (29,9%) de grau III e IV. Quanto a sobrevida global e livre de doença, o grau de necrose tumoral não foi uma variável significativa. Um fator que pode ter contribuído para tal resultado é que foi considerado o grau de necrose relatado no laudo anatomopatológico da época, este foi analisado por inúmeros patologistas diferentes sem uniformidade do método, e que por dificuldades técnicas não pôde ser revisto nesta análise.

O tipo histológico condroblástico geralmente esta associado a menor grau de necrose, seguido por osteoblástico, fibroblástico e telangiectásico que seria o melhor respondedor conforme BACCI et al. (1998a ou b), OKADA e al (1999) e BACCI et al. (2001a). Estes tem atribuído esta diferença de resposta a diferentes potenciais biológicos (AYALA et al. 1984), quimiosensibilidades e algumas vezes diferente vascularização (BACCI et al. 2001a). Em nossa série o tipo histológico mais freqüente foi o osteoblástico com 70 casos (72,2%), 20(20,6%) condroblástico e 7 (7,2%) fibroblásticos porém quando correlacionamos com grau de necrose de Huvos não encontramos qualquer diferença entre os subtipos histológicos (dado não demonstrado), também o tipo histológico não foi uma variável importante para a sobrevida livre de doença ou global.

A maioria da nossa casuística foi submetida a quimioterapia, seja no período pré-operatório ou pós operatório. Apenas 7 pacientes não fizeram quimioterapia. Como trata-se

de uma amostra retrospectiva não houve uniformidade entre os esquemas de quimioterapia, o que torna uma variável dificultadora de análise. Apesar disto, quando avaliamos cada esquema de quimioterapia pré-operatória, correlacionamos com grau de necrose, tipo de cirurgia ou sobrevida e não evidenciamos qualquer diferença significativa entre estes. Já a quimioterapia pós-operatória independente do esquema realizado demonstrou benefício significativo na sobrevida global, tanto na análise univariada ( $p= 0,023$ ) quanto multivariada. Esse dado é importante e compatível com a história do osteossarcoma com aumento da sobrevida após o advento da quimioterapia adjuvante. O Pediatric Oncology Group (GOORIN et al, 2003) comparou o momento da quimioterapia pré e pós-operatória e observou o benefício da quimioterapia em ambos os grupos, sem diferença de vantagem para a sobrevida livre de doença para a quimioterapia pré-operatória. Hoje alguns autores preconizam o uso da quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante) pelas informações de fatores prognósticos nos espécimes cirúrgicos, identificação de grupos de riscos e por acreditar no aumento do número de candidatos a cirurgia conservadora mesmo sem aumento da sobrevida global e livre de doença.(WINKLER et al 1984; WEINER et al. 1986; MEYERS et al 1992;BACCI et al 1993) Porém a prevenção de doença precoce independe do momento em que a quimioterapia é administrada.(GOORIN et al 2003)

## **7.2 DADOS IMUNOISTOQUÍMICOS**

Apesar dos grandes avanços no tratamento do osteossarcoma nos últimos trinta anos, a busca por resultados ainda melhores se mantém. Estratificar os pacientes em grupos de risco para recidiva e óbito por tumor, para que o grupo de alto risco possa ser tratado de forma mais agressiva e o grupo de baixo risco eventualmente possa ser poupado de maiores toxicidades é um dos objetivos a ser alcançado. Assim utilizamos alguns marcadores moleculares que participam do ciclo celular para auxiliar nesta estratificação.

### **Imunoistoquímica do c-erbB-2**

O gene c-erbB-2 codifica uma proteína transmembrana ou receptor HER2 que atua na transdução de sinal do fator de crescimento celular, atuando no controle do crescimento na divisão e diferenciação celular. Em carcinomas de mama quando encontra-se amplificado ou hiperexpresso está relacionado a agressividade tumoral, disseminação tumoral precoce e maior resistência ao tratamento. A imunoistoquímica é capaz de diferenciar entre o nível de proteína associada a amplificação do c-erbB-2 e os níveis de proteína normal (HOANG et al. 2000, JACOBS et al. 2000). Em osteossarcoma este gene encontra-se expresso em 42% dos casos e também está associado a presença de metástases pulmonares, menor sobrevida e refratariedade ao tratamento.(ONDA et al. 1996; GORLICK et al. 1999). Nesta série observamos que a imunoreatividade de membrana do c-erbB-2 foi positiva em apenas 16 casos (16,5%) negativa em 78 (80,4%), e não avaliável em 3(3,1%). Não houve associação da imunoreatividade do c-erbB-2 e fatores clínico-demográficos ou anatomopatológicos.

A positividade do c-erbB-2 nesta série foi baixa em relação a literatura, certamente um dos motivos foi por ser um estudo retrospectivo, tratar-se de uma amostra antiga e que não utilizou material a fresco. Assim problemas técnicos relacionados a fixação do tecido (tempo e natureza da fixação) e processamento da amostra (temperatura em que foi embebida a parafina) prejudicam a avaliação pelo método imunoistoquímico.(JACOBS et al. 1999 e 2000).

Outro fator que pode estar relacionado a baixa positividade do c-erbB-2 nesta série, foi fato de que alguns autores consideram positivos casos com positividade de membrana fraca (+1), o que não foi considerado nesta série. Consideramos positivos apenas os casos com marcação de membrana de no mínimo, fraca a moderada em > 10% das células tumorais (+2 ou +3).

Assim a análise deste em material a fresco ou por outro método que não imunoistoquímico, pode ser mais fidedigno.



### **Imunoistoquímica das Caderinas**

As caderinas são glicoproteínas de membrana que atuam como moléculas de adesão celular, responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos (ALBERTS et al. 1997) e também pela progressão do carcinoma promovendo alteração na morfologia, invasão e metástase.(KASHIMA et al. 1999). Elas se apresentam com graus variados de expressão tecidual, sendo a E-caderina encontrada em todo epitélio normal e a P-caderina no trofoblasto e restrita a expressão epitelial. Como a E-caderina atua como supressora de invasão, vários trabalhos associam a perda da expressão da caderina com maior risco de invasão e metástase nos diversos tumores, como bexiga, pulmão, laringe e estômago (UMBAS et al. 1992; SMITH e PIGNATELLI 1997; MONAGHAN et al. 2001; LEE et al. 2002, RODRIGO et al. 2002). Menos conhecida é a função da caderina em tumores mesenquimais. A E-caderina esta associada ao fenótipo epitelíóide em alguns sarcomas de partes moles, contudo tem sido reportado que em osteossarcoma não é expressa (MONAGHAN et al. 2001). Conforme KASHIMA et al. (2002) as diversas formas de Caderinas podem ser detectadas em osteoblastos através de RT-PCR, entretanto a nível proteico apenas a caderina-11 e a N-caderina podem ser encontradas, o que explica este achado de negatividade da E-caderina em 100% da nossa amostra, esses dados confirmam dados da literatura.

A Pan-caderina nesta série demonstrou-se positiva em 94 casos (96,9%) da amostra e negativa em 03 casos (3,1%), a imunoreatividade não apresentou qualquer relação com fatores clínicos demográficos ou anatomopatológicos, porém a negatividade da Pan-caderina foi relacionada na análise univariada e multivariada com a sobrevida livre de doença e global.

### **Imunoistoquímica do APC / Beta-Catenina**

Da mesma forma que a caderina, membros da família da catenina, especialmente a Beta-catenina estão envolvidas na sinalização intracelular como membro da via WNT. O produto do gene APC regula o complexo caderina-catenina e a Beta-catenina. Estas podem atuar com outras proteínas em uma via de sinalização comum envolvendo Tcf/LEF-1 e estimulando a proliferação celular.

Em um único relato na literatura que associa APC e osteossarcoma, em nove pacientes este foi positivo em 100% da amostra e apesar da pequena casuística o autor conclue que a expressão de APC nas células tumorais de osteossarcoma lembram o padrão de osteoblastos do osso normal e que anormalidades neste podem ser importantes na formação de tumores ósseos e na evolução clínica (MONAGHAN et al. 2001). Em nossa casuística o APC foi positivo em 65 pacientes (67%) e negativa em 28 casos (28,9%) Não houve associação entre a imunoreatividade do APC e variáveis clínico-demográficas exceto idade ( $p=0,025$ ), onde o APC foi mais positivo em pacientes com até 18 anos. Devido a escassez de dados referentes ao papel da APC na gênese e na evolução do osteossarcoma não há como comparar este dado com o de outros autores, talvez este possa ser um dado somatório para explicar melhor prognóstico em pacientes neste grupo etário e pior evolução na faixa etária mais avançada fartamente relatada na literatura. Dentre as variáveis como tamanho tumoral, grau de necrose e tipo histológico a imunoreatividade do APC não evidenciou qualquer diferença estatisticamente significativa.

Para a sobrevida global o grupo do APC negativo apresentou menor sobrevida (36,9% x 63,2% em 05 anos) ( $p= 0,051$ ). Porém ao se incluírem as variáveis relacionadas ao tratamento na análise multivariada o APC e a variável quimioterapia pós-operatória foram excluídas mutuamente, o que sugeriu uma interação entre ambas. Quando avaliamos a interação entre estas e selecionamos os pacientes em quatro grupos, encontramos uma diferença de sobrevida. No grupo 0 – APC negativo e sem quimioterapia pós-operatória (07

casos- SG em 05 anos foi de 42,8%); no grupo 1-APC positivo, sem quimioterapia pós-operatória (21 casos- SG em 05 anos foi de 38,1%); no grupo 2- APC negativo e que realizou quimioterapia pós-operatória (13 casos – SG em 05 anos foi de 34%) ; e o grupo 3- APC positivo e que realizou a quimioterapia pós-operatória (52 casos- SG em 05 anos foi de 69,9%). Estes dados sugerem que os pacientes que apresentam imunorreatividade do APC apresentam maior benefício com a quimioterapia pós-operatória, refletindo uma maior sobrevida 69,9% ( $p=0,002$ ) em relação aos demais grupos. E os pacientes com perda da expressão de APC, independente da quimioterapia pós-operatória apresentam uma sobrevida desfavorável.

A beta-catenina nesta série apresentou-se positiva em 03 pacientes (3,1%), negativa em 87 (89,7%) e não demonstrou associação com variáveis clínico-demográficas ou anatomopatológicas, sobrevida livre de doença e global. É relatado que a  $\beta$ -catenina, APC e caderina são fortemente expressos em osteoclastos e osteoblastos e que esta expressão é perdida quando as células ósseas se diferenciam em osteócitos, e que a expressão destes em osteossarcoma é semelhante a osteoblastos do osso normal. Contudo caderinas e Beta-catenina positivas em osteócitos foram identificadas em nidus do osteoma osteóide e nas células de osteossarcomas. Não se sabe se este fato representa uma fase de transição na diferenciação de osteoblastos em osteócitos ou um fenômeno de transformação celular. Parece que a negatividade da  $\beta$ -catenina é um evento inicial na gênese dos sarcomas (MONAGHAN et al. 2001).

Os achados desta análise sugerem o papel do APC na regulação da função dos osteoblastos e osteoclastos e reforçam a importância da interação da via catenina-caderina na regulação da atividade da célula óssea. Anormalidades de função destas moléculas podem ser importantes na formação e evolução dos tumores ósseos e nossos achados reforçam estes dados

## 7.3 ANÁLISE DE SOBREVIDA

### 7.3.1 Sobrevida Livre de Doença

A taxa de sobrevida livre de doença para esta população (83 casos) foi de 48,9% com média de 48,4 (DP=41,8) e mediana de 32,4 meses.

Das variáveis clínico-demográficas analisadas apenas a raça ( $p=0,028$ ), foi considerada significativa para sobrevida livre de doença em análise uni e multivariada. A raça não branca foi fator significativo para sobrevida livre de doença. Este dado é intrigante, e pode estar relacionado a fatores outros de ordem sócio-econômico e biológicas, dificuldades de categorização do tipo de raça em dados de prontuário, do que a própria raça em si. Nossa análise foi retrospectiva, em uma população brasileira cuja prevalência de miscigenação é muito grande, e onde a população de não brancos nesta análise é constituída por 15 casos de “parda”, 01 amarelo e o 5 negros.(dados não demonstrados)

Em relação as variáveis relacionadas ao tratamento apenas o período foi considerado estatisticamente significativo ( $p<0,001$ ) na análise multivariada, onde pacientes submetidos a cirurgia no período após 1990 obtiveram maior sobrevida livre de doença. Antes de 1990 os exames diagnósticos apresentavam uma grande limitação para diagnóstico da doença micrometastática o que fez alguns destes casos serem considerados ao diagnóstico como não metastáticos, mas que na realidade eram metastáticos e não diagnosticados pelos métodos disponíveis na época, o que representou um diminuição no intervalo livre de metástase neste grupo. Assim o período da cirurgia se mostrou uma variável de ajuste do modelo, onde a melhora tecnológica dos exames diagnósticos associada a maior disponibilidade dos mesmos, colaboraram para melhores resultados no período após 1990.

Dos marcadores imunostiquímicos avaliados apenas a imunorreatividade para Pancaderina ( $p<0,001$ ) [HR 127,68 (IC 95% = 11,29 – 1143,24)] foi estatisticamente significativa na análise univariada e multivariada para sobrevida livre de doença. A perda da

expressão da Pan-caderina (Pan-caderina negativa) apesar de pequena casuística (02 casos) e do curto período de seguimento (máximo de 4,6 meses) foi um fator independente para uma menor sobrevida livre de doença. A perda desta molécula com capacidade de adesão celular, predispõe a mecanismos de invasão e metástases .

### **7.3.2 Sobrevida Global**

A sobrevida global nesta população (97 casos) foi de 55,2% em 05 anos. Não observamos diferença na sobrevida global entre pacientes com doença metastática ao diagnóstico e ao seguimento (considerada sobrevida da data da metástase ao óbito). Nenhuma variável clínico-demográfica ou anatomopatológica apresentou correlação estatisticamente significativa com a sobrevida global.

Das variáveis imunoistoquímicas e relacionadas ao tratamento apenas a imunorreatividade da Pan-caderina ( $p < 0,001$ ) e interação da quimioterapia pós-operatória com a imunorreatividade do APC foram significativas para a sobrevida global na análise univariada multivariada.

Apesar da pequena casuística, os 03 casos de Pan-caderina negativa, evoluíram de forma bastante desfavorável, com sobrevida global em 05 anos de 0%, e o grupo positivo com sobrevida de 57% em 05 anos. Este fato pode estar relacionado ao grau de diferenciação e ao estado funcional destas células (MONAGHAN et al. 2001). Por tratar-se de uma molécula de adesão celular a perda da expressão desta, está relacionada a perda da integridade tecidual e facilitador para a carcinogênese, invasão e metástase, proporcionando um grupo de evolução desfavorável. Como o grupo com perda de expressão de Pan-caderina corresponde a apenas 03 casos, para maiores conclusões necessitaríamos de aumentar a amostra.

As variáveis imunorreatividade do APC e quimioterapia pós-operatória quando acrescentadas separadamente na análise multivariada ambas foram eliminadas do modelo, mas quando analisadas em conjunto foram significativas.

Assim no modelo final as duas variáveis, a imunorreatividade da Pan-caderina e a interação (imunorreatividade do APC e quimioterapia pós-operatória) ambas foram consideradas fatores independentes para sobrevida global. Onde a imunorreatividade do APC sugere o grupo que apresenta maior benefício com a quimioterapia pós-operatória e aqueles com perda da expressão do APC independente da quimioterapia pós-operatória apresentam pobre sobrevida.

Já que a literatura que associa APC e osteossarcoma é pobre, estes achados são de grande importância, e principalmente por sugerir um grupo que pode ter maior benefício com a quimioterapia. Podendo eventualmente este grupo ser tratado com esquemas mais agressivos. Tão importante ou mais, é a identificação de grupos que independente da quimioterapia instituída apresentam pobre resposta, neste subgrupo a introdução de novas modalidades terapêuticas, novas drogas e participação em estudos clínicos devem ser encorajadas. Assim novos estudos se possíveis prospectivos e com maior casuística são importantes, com a análise destes marcadores imunistoquímicos (APC e Pan-caderina) para validação destes dados.

***CONCLUSÕES***

---

## 8 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo podemos concluir que:

1. Não houve associação estatisticamente significativa das variáveis clínico-demográficas e anatomopatológicas com a expressão imunohistoquímica de c-erbB-2, Pan-caderina, E-caderina e  $\beta$ -catenina. A imunoreatividade do APC associou-se apenas com a variável idade ( $p=0,025$ ).
2. Na análise multivariada para a sobrevida livre de doença e sobrevida global a imunoreatividade da Pan caderina foi considerada uma variável independente apesar da pequena casuística. Sendo ao perda da expressão da Pan-caderina relacionada a pior sobrevida.
3. A interação das variáveis imunoreatividade do APC e quimioterapia pós-operatória permitiu identificar grupos prognósticos. O grupo APC positivo e que realizou quimioterapia pós-operatória apresentou maior sobrevida enquanto aqueles com perda de expressão do APC independente de quimioterapia pós-operatória, ou com manutenção da expressão do APC mas que não fizeram quimioterapia, representam o grupo de prognóstico reservado.



## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. **EMBO J** 1997; 16:3797-804.

Abramson DH, Ellsworth RM, Kitchin FD, Tung G. Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced? **Ophthalmology** 1984; 91:1351-5.

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 a matriz extracelular; p.949-1009.

Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. **Science** 1986; 232:1644-6.

Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. **FEBS Lett** 1997; 410:83-6.

Araki N, Uchida A, Kimura T, et al. Involvement of the retinoblastoma gene in primary osteosarcomas and other bone and soft-tissue tumors. **Clin Orthop** 1991; 270:271-7.

Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. **Curr Opin Cell Biol** 1999; 11:255-60.

Aue G, Muralidhar B, Schwartz HS, Butler MG. Telomerase activity in skeletal sarcomas. **Ann Surg Oncol** 1998; 5:627-34.

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, Picci P, Ruggieri P, et al. Primary chemotherapy and delayed surgery (neoadjuvant chemotherapy) for osteosarcoma of the extremities. The Istituto Rizzoli Experience in 127 patients treated preoperatively with intravenous methotrexate (high versus moderate doses) and intraarterial cisplatin. **Cancer** 1990; 65:2539-53.

Bacci G, Picci P, Ferrari S, et al. Primary chemotherapy and delayed surgery for nonmetastatic osteosarcoma of the extremities. Results in 164 patients preoperatively treated with high doses of methotrexate followed by cisplatin and doxorubicin. **Cancer** 1993; 72:3227-38.

Bacci G, Ferrari S, Ferraro, et al. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities. **Ital Orthop Traumatol** 1994; 20:311-29.

Bacci G, Ferrari S, Donati D, et al. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremity in patients in the fourth and fifth decade of life. **Oncol Rep** 1998a; 5:1259-63.

Bacci G, Ferrari S, Delepine N, et al. 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** 1998b;16:658-63.

Bacci G, Lari S. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy in osteosarcoma. **Chir Organi Mov** 2001; 86:253-68.

Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, et al. Histologic response of high-grade nonmetastatic osteosarcoma of the extremity to chemotherapy. **Clin Orthop** 2001a; (386):186-96.

Bacci G, Ferrari S, Tienghi A, et al. A comparison of methods of loco-regional chemotherapy combined with systemic chemotherapy as neo-adjuvant treatment of osteosarcoma of the extremity. **Eur J Surg Oncol** 2001b; 27:98-104.

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** 2002; 24:27-30.

Baldini N, Scotlandi K, Barbanti-Brodano G, et al. Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. **N Engl J Med** 1995; 333:1380-5.

Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. **Nature** 1986; 319:226-30.

Behrens J, Vakaet L, Friis R, et al. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. **J Cell Biol** 1993; 120:757-66.

Belchis DA, Meece CA, Benko FA, Rogan PK, Williams RA, Gocke CD. Loss of heterozygosity and microsatellite instability at the retinoblastoma locus in osteosarcomas. **Diagn Mol Pathol** 1996; 5:214-9.

Belchis DA, Gocke CD, Geradts J. Alterations in the Rb, p16, and cyclin D1 cell cycle control pathway in osteosarcoma. **Ped Pathol Mol Med** 2000; 19:377-89.

Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, et al. Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma. **Int J Cancer** 1999; 84:489-93.

Bentzen SM, Poulsen HS, Kaae S, et al. Prognostic factors in osteosarcomas: a regression analysis. **Cancer** 1988; 62:194-202.

Bielack S, Ertman R, Looft G, et al. Platinum disposition after intraarterial and venous infusion of cisplatin for osteosarcoma. **Cancer Chemother Pharmacol** 1988; 24:376-80.

Bielack SS, Flege S, Kempf-Bielack, et al. Osteosarcoma in adults: an analysis of 340 patients in the third decade of life or later. **Ann Oncol** 2000; 11:125-32.

Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. **J Clin Oncol** 2002; 20:776-90.

Bieling P, Rehan N, Winkler P, et al. Tumor size and prognosis in aggressively treated osteosarcoma. **J Clin Oncol** 1996; 14:848-58.

Bramwell VH, Burgers M, Sneath R, et al. A comparison of two short intensive adjuvant chemotherapy regimens in operable osteosarcoma of limbs in children and young adults: the first study of the European Osteosarcoma Intergroup. **J Clin Oncol** 1992; 10:1579-91.

Bramwell VH. Osteosarcomas and other 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. VT, Hellman S, Rosenberg SA, editors. **Cancer principles & practice of oncology**, 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p.1841-935.

Broström LA. On the natural history of osteosarcoma: aspects of diagnosis, prognosis and endocrinology. **Acta Orthop Scand Suppl** 1980; 183:1-38.

Bryan WR, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. **Curr Opin Cell Biol** 1991; 11:318-24.

Bryan WR, Shimkin MB. Quantitative analysis of dose-response data obtained with carcinogenic hydrocarbons. **J Natl Cancer Inst** 1941; 1: 807-33.

Butt AJ, Firth SM, Baxter RC. The IGF axis and programmed cell death. **Immunol Cell Biol** 1999; 77:256-62.

Carsi B, Rock MG. Primary osteosarcoma in adults older than 40 years. **Clinical Orthopaedics and related research** 2002; 397: 53-61.

Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1260-70.

Chan HS, Grogan TM, Haddad G, DeBoer G, Ling V. P-glycoprotein expression: critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1706-15.

Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol** 2001; 11:S37-43.

Cheng SL, Lecanda F, Davidson MK, et al. Human osteoblasts express a repertoire of cadherins, which are critical for BMP-2-induced osteogenic differentiation. **J Bone Miner Res** 1998; 13:633-44.

Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. **Trends Biochem Sci** 1999; 24:73-6.

Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. **Science** 1985; 230:1132-9.

Czerniak B. **Bone tumors**. St. Louis: C. V. Mosby; 1998. Osteosarcoma; p.128-252.

Davis AM, Bell RS, Goodwin PJ. Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review. **J Clin Oncol** 1994; 12:423-31.

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 of the literature. **Cancer** 1996; 78:2127-35.

Di Fiore PP, Pierce JH, Fleming TP, et al. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. **Cell** 1987; 51:1063-70.

Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. **Cancer** 1995; 75:203-10.

Duffy MJ. Cancer metastasis: biological and clinical aspects. **Ir J Med Sci** 1998; 167:4-8

Dunn D, Dehner LP. Metastatic osteosarcoma to lung: a clinicopathologic study of surgical biopsies and resections. **Cancer** 1977; 40:3054-64

Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. **Clin Orthop** 1980; (153):106-20.

Fedi P, Tronick SR, Aaronson SA. Growth factors. In: Holland JF, Bast RC, Morton DL, et al. editors. **Cancer medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997. p.41-64.

Ferrari SL, Traianedes K, Thorne M, et al. A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype. **J Bone Miner Res** 2000; 15:198-208.

Feugeas O, Guriec N, Babin-Boilletot A, et al. Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma. **J Clin Oncol** 1996; 14:467-72. Erratum in: *J Clin Oncol* 1996; 14:2411.

Fuchs N, Bielack SS, Epler D, et al. Long-term results of the co-operative German-Austrian-Swiss osteosarcoma study group's protocol COSS-86 of intensive multidrug chemotherapy and surgery for osteosarcoma of the limbs. **Ann Oncol** 1998; 9:893-9.

Fuchs B, Pritchard DJ. Etiology of osteosarcoma. **Clin Orthop** 2002; (397):40-52.

Fukushige S, Matsubara K, Yoshida M, et al. Localization of a novel v-erbB-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.

Garcia RJ, Consentino E, Camargo OP, et al. Tratamento ortopédico do osteossarcoma: Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento do Osteossarcoma. **Rev Bras Ortop** 1996; 31:871-8.

Giunti A, Laus M. Malignant tumours in chronic osteomyelitis (A report of thirty nine cases, twenty six with long term follow up). **Ital J Orthop Traumatol** 1978; 4:171-82

Glasser DB, Lane JM. Stage IIB osteogenic sarcoma. **Clin Orthop** 1991; (270):29-39.

Glasser DB, Lane JM, Huvos AG, Marcove RC, Rosen G. Survival, prognosis, and therapeutic response in osteogenic sarcoma. The Memorial Hospital experience. **Cancer** 1992; 69:698-708.

Goorin AM, Perez-Atayde A, Gebhardt M, et al. Weekly high-dose methotrexate and doxorubicin for osteosarcoma: the Dana-Farber Cancer Institute/the Children's Hospital--study III. **J Clin Oncol** 1987; 5:1178-84.

Goorin AM, Schwartzentruber DJ, Devidas M, et al. 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, Huvos AG, Heller G, et al. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. **J Clin Oncol** 1999; 17:2781-8.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. **AJCC cancer staging handbook**. 6<sup>th</sup> ed. New York: Springer Verlag; 2002. Musculoskeletal sites: bone; p.211-20.

Guo W, Wang X, Feng C. P53 gene abnormalities in osteosarcoma. **Chin Med J (Engl)** 1996; 109:752-5.

Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2002; 34:255-68.

Hamre M, Chuba PJ, Yap J, et al. Osteosarcoma (OS) as a second primary malignant neoplasm [Abstract]. **Proc Am Soc Clin Oncol** 1999; 18: A545.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell** 1996; 86:353-64.

Hansen MF, Nellissery MJ, Bhatia P. Common mechanisms of osteosarcoma and Paget's disease. **J Bone Miner Res** 1999; 14 Suppl 2:39-44.



Heater K, Collins PA. Osteosarcoma in association with infarction of bone: report of two cases. **J Bone Joint Surg Am** 1987; 69:300-2.

Henshaw RM, Bickles J, Malawer MM. Modular endoprosthesis reconstruction for lower extremity skeletal defects: oncologic and reconstructive indications. **Semin Arthroplasty** 1999; 10:180-7.

Hoang MP, Sahin AA, Ordonez NG, Sneige N. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. **Am J Clin Pathol** 2000; 113:852-9.

Hoffer FA, Nikanorov AY, Reddick WE, et al. Accuracy of MR imaging for detecting epiphyseal extension of osteosarcoma. **Pediatr Radiol** 2000; 30:289-98.

Holland JF, Bast RC, Jr, Morton DL, Frei III E, Kyfe DW, Weischelbaum RR. Neoplasms of the bone and soft tissue. In: Holland JF, Bast RC, Jr., Morton DL, Frei III E, Kyfe DW, Weischelbaum R, editors. **Cancer medicine**. 4<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. p.2503-57.

Hosalkar HS, Dormans JP. Limb sparing surgery for pediatric musculoskeletal tumors. **Pediatr Blood Cancer** 2004; 42:295-310.

Hunter T. Oncoprotein networks. **Cell** 1997; 88:333-46.

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.

Isola J, Chu L, DeVries S, et al. Genetic alterations in ERBB2-amplified breast carcinomas. **Clin Cancer Res** 1999; 5:4140-5.

Inada S, Koto T, Futami K, Arima S, Iwashita A. Evaluation of malignancy and the prognosis of esophageal cancer based on an immunohistochemical study (p53, E-cadherin, epidermal growth factor receptor). **Surg Today** 1999; 29:493-503.

Iwao K, Miyoshi Y, Nawa G, Yoshikawa H, Ochi T, Nakamura Y. Frequent beta-catenin abnormalities in bone and soft-tissue tumors. **Jpn J Cancer Res** 1999; 90:205-9.

Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. **J Clin Oncol** 1999; 17:1983-7.

Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ, Schnitt SJ. HER-2/neu protein expression in breast cancer evaluated by immunohistochemistry. A study of interlaboratory agreement. **Am J Clin Pathol** 2000; 113:251-8.

Jaffe N, Frei E 3rd, Watts H, Traggis D. High-dose methotrexate in osteogenic sarcoma: a 5-year experience. **Cancer Treat Rep** 1978; 62:259-64.

Jaffe N, Prudich J, Knapp J, et al. Treatment of primary osteosarcoma with intra-arterial and intravenous high-dose methotrexate. **J Clin Oncol** 1983; 1:428-31.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. **CA Cancer J Clin** 2004; 54:8-29.

Jimenez RE, Wallis T, Tabaszka P, Visscher DW. Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. **Mod Pathol** 2000; 13:37-45.

Johnston RM, Miles JS. Sarcomas arising from chronic osteomyelitic sinuses: a report of two cases. **J Bone Joint Surg Am** 1973; 55:162-8.

Kawai A, Muschler GF, Lane JM, Otis JC, Healey JH. Prosthetic knee replacement after resection of a malignant tumor of the distal part of the femur: medium to long-term results. **J Bone Joint Surg Am** 1998; 80:636-47.

Kaya M, Wada T, Akatsuka T, et al. Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. **Clin Cancer Res** 2000; 6:572-7.

Kashima T, Kawaguchi J, Takeshita S, et al. Anomalous cadherin expression in osteosarcoma. Possible relationships to metastasis and morphogenesis. **Am J Pathol** 1999; 155:1549-55.

Kashima T, Nakamura K, Kawaguchi J, et al. Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. **Int J Cancer** 2003; 104:147-54.

Kim YC, Park KO, Kern JA, et al. The interactive effect of Ras, HER2, P53 and Bcl-2 expression in predicting the survival of non-small cell lung cancer patients. **Lung Cancer** 1998; 22:181-90.

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** 2002; (396):184-90.

Kitchin FD, Ellsworth RM. Pleiotropic effects of the gene for retinoblastoma. **J Med Genet** 1974; 11:244-6.

Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, et al. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. **Cancer Res** 1999; 59:3880-2.

Kuryu M, Ozaki T, Nishida K, Shibahara M, Kawai A, Inoue H. Expression of CD44 variants in osteosarcoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 1999; 125:646-52.

Ladanyi M, Cha C, Lewis R, Jhanwar SC, Huvos AG, Healey JH. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. **Cancer Res** 1993; 53:16-8.

Ladanyi M, Gorlick R. Molecular pathology and molecular pharmacology of osteosarcoma. **Ped Pathol Mol Med** 2000; 19:391-413.

Lee YH, Tokunaga T, Oshika Y, et al. Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. **Eur J Cancer** 1999; 35:1089-93.

Lee YC, Wu CT, Chen CS, Hsu HH, Chang YL. The significance of E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin expression in surgically treated non-small cell lung cancers of 3 cm or less in size. **J Thorac Cardiovasc Surg** 2002; 123:502-7.

Lei S, Appert HE, Nakata B, Domenico DR, Kim K, Howard JM. Overexpression of HER2/neu oncogene in pancreatic cancer correlates with shortened survival. **Int J Pancreatol** 1995; 17:15-21.

Letson GC, Muro-Cacho CA. Genetic and molecular abnormalities in tumors of the bone and soft tissue. **Cancer Control** 2001; 8:239-51.

Lewis IJ, Weeden S, Machin D, Stark D, Craft AW. Received dose and dose-intensity of chemotherapy and outcome in nonmetastatic extremity osteosarcoma. European Osteosarcoma Intergroup. **J Clin Oncol** 2000; 18:4028-37..

Link MP, Goorin AM, Miser AW, et al. 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 M, Eilberg F. Osteosarcoma. In: Pizzo P, Poplack D, editors. **Principles and practice of pediatric oncology**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott- Raven; 2002. p.1051-89.

Lonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M. p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. **Cancer** 1997; 79:1541-7.

Lopes A, Rossi BM, Nakagawa WT. Oncologia cirúrgica. **Acta Oncol Bras** 1993; (1,2,3):42-7.

Macedo CR, Petrilli AS. Tumores ósseos malignos na criança e no adolescente. **Pediatr Mod** 1999; 35:600-1,604-6,608.

Malawer MM, Chou LB. Prosthetic survival and clinical results with use of large-segment replacements in the treatment of high-grade bone sarcomas. **J Bone Joint Surg Am** 1995; 77:1154-65.

Mangues R, Giraldes J, Bilbao JL, et al. Clinical and experimental pharmacokinetics of intraarterial cisplatinum (CDP) advantages over intravenous. **Proc ECC** 1988; 4/75.

Mardinger O, Givol N, Talmi YP, Taicher S. Osteosarcoma of the jaw: The Chaim Sheba Medical Center experience. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2001; 91:445-51.

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.

Masuda H, Miller C, Koeffler HP, Battifora H, Cline MJ. Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1987; 84:7716-9.

McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). **Proc Natl Acad Sci U S A** 1986; 83:130-4.

McNain JD, Damron TA, Landas SK, Ambrose JL, Shrimpton AE. Inheritance of osteosarcoma and Paget's disease of bone: a familial loss of heterozygosity study. **J Mol Diagn** 2001; 3:171-7.

Meyer T, Hart IR. Mechanisms of tumour metastasis. **Eur J Cancer** 1998; 34:214-21.

Meyer JS, Mackenzie W. Malignant bone tumors and limb-salvage surgery in children. **Pediatr Radiol** 2004; 34:1030.

Meyers PA, Heller G, Healey J, et al. Chemotherapy for non metastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. **J Clin Oncol** 1992; 10:5-15.

Meyers PA. High-dose therapy with autologous stem cell rescue for pediatric sarcomas. **Curr Opin Oncol** 2004; 16:120-5.

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.

Miller CW, Aslo A, Won A, Tan M, Lampkin B, Koeffler HP. Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 1996; 122:559-65.

Mirra JM, Gold RH, Piero P. Osseous tumors of intramedullary origin. In: Mirra JM, editor. **Bone tumours: clinical radiologic and pathologic correlations**. Philadelphia: Lea & Febiger; 1989. p.143-438.

Monaghan H, Bubb VJ, Sirimujalin R, Millward-Sadler SJ, Salter DM. Adenomatous polyposis coli (APC), beta-catenin, and cadherin are expressed in human bone and cartilage. **Histopathology** 2001; 39:611-9.

Nadel HR, Stilwell ME. Nuclear medicine topics in pediatric musculoskeletal disease: techniques and applications. **Radiol Clin North Am** 2001; 39:619-51.

Neal DE, Sharples L, Smith K, Fennelly J, Hall RR, Harris AL. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. **Cancer** 1990; 65:1619-25.

Okada K, Unni KK, Swee RG, Sim FH. High grade surface osteosarcoma: a clinicopathologic study of 46 cases. **Cancer** 1999; 85:1044-54.

Okada K, Hasegawa T, Nishida J, et al. Osteosarcomas after the age of 50: a clinicopathologic study of 64 cases: an experience in northern Japan. **Ann Surg Oncol** 2004; 11:998-1004.

Oliveria AB, De Luca LA, Carvalho GT, Arias VEA, Carvalho LR, Assunção MC. Imunoexpressão do c-erbB-2 nas lesões proliferativas intraductais da mama de mulheres. **Rev Assoc Med Bras** 1992; 50:324-29.

Onda M, Matsuda S, Higaki S, et al. ErbB-2 expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. **Cancer** 1996; 77:71-8.

Penna V, Lopes A, Tanaka MH, Chung WT, Melaragno R, Epelman S. Osteosarcoma: tratamento multidisciplinar. **Rev Bras Ortop** 1993; 28:791-4.

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. **Nature** 1998; 392:190-3.

Peterson LFA, Brown AL, Janes JM. The ultrastructure of beryllium-induced osteogenic sarcoma in the rabbit. **J Bone Joint Surg** 1964; (46):920.

Petrilli AS, Penna V, Lopes A, Figueiredo MT, Gentil FC. IIB osteosarcoma. Current management, local control, and survival statistics--Sao Paulo, Brazil. **Clin Orthop** 1991a; (270):60-6.

Petrilli AS, Gentil FC, Epelman S, et al. Increased survival, limb preservation, and prognostic factors for osteosarcoma. **Cancer** 1991b; 68:733-7.

Pochanugool L, Subhadharaphandou T, Dhanachai M, et al. Prognostic factors among 130 patients with osteosarcoma. **Clin Orthop** 1997; (345):206-14.

Pompetti F, Rizzo P, Simon RM, et al. Oncogene alterations in primary, recurrent, and metastatic human bone tumors. **J Cell Biochem** 1996; 63:37-50.

Press MF, Pike MC, Hung G, et al. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. **Cancer Res** 1994; 54:5675-82.

Press MF, Bernstein L, Thomas PA, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. **J Clin Oncol** 1997; 15:2894-904.

Price G. Primary bone forming tumours and their relationship to skeletal growth. **J Bone Joint Surg** 1958; 40:574-93.

Pritchard DJ, Finkel MP, Reilly CA, Jr. The etiology of osteosarcoma; a review of current considerations. **Clin Orthop** 1975; (111):14-22.

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

Ragland BD, Bell WC, Lopez RR, Siegal GP. Cytogenetics and molecular biology of osteosarcoma. **Lab Invest** 2002; 82:365-73.

Ramburan A, Oladiran F, Smith C, Hadley GP, Govender D. Microsatellite analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene and immunoexpression of beta catenin in nephroblastoma: a study including 3 cases treated with preoperative chemotherapy. **J Clin Pathol** 2005; 58:44-50.

Raymond AK, Chawla SP, Carrasco CH, et al. Osteosarcoma chemotherapy effect: a prognostic factor. **Semin Diagn Pathol** 1987; 4:212-36.

Raymond AK, Ayala AG, Knuutila S. Conventional osteosarcoma. In: Fletcher CFM, Unni KK, Mertens F, editors. **Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press; 2002. p.264-85. (World Health Organization Classification of Tumours-International Agency for Research on Cancer).

Rech A, Castro CG, Jr, Mattei J, et al. Clinical features in osteosarcoma and prognostic implications. **J Pediatr (Rio Janeiro)** 2004; 80:65-70.

Refaat Y, Gunnoe J, Hornicek FJ, Mankin HJ. Comparison of quality of life after amputation or limb salvage. **Clin Orthop** 2002; (397):298-305.

Ridolfi RL, Jamehdor MR, Arber JM. HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization approach. **Mod Pathol** 2000; 13:866-73.

Roche PC, Ingle JN. Increased HER2 with U.S. Food and Drug Administration-approved antibody. **J Clin Oncol** 1999; 17:434.



Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. **Eur J Cancer** 2002; 38:1059-64.

Rodriguez RP. Amputation surgery and prostheses. **Orthop Clin North Am** 1996; 27:525-39

Rosemberg AE. Bones, joints and soft tissue tumors. In: Kumar VK, Abbas AK, Fausto N, editors. **Robbins and Cotran pathologic basis of the disease**. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.1273-324.

Rosen G, Caparros B, Huvos AG, et al. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. **Cancer** 1982; 49:1221-30.

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.

Rous P, Murphy JB, Tytler WH. A filterable agent the cause of a second chicken-tumor, an osteochodrosarcoma. **JAMA** 1912; 59:1973-4.

Rubert CK, Mlawer MM, Kellar KL. Modular endoprothetic replacement of the proximal humerus: indications, surgical thecnique, and results. **Semin Arthroplasty** 1999; 10:142-53.

Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Munemitsu S, Polakis P. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. **Cancer Res** 1997; 57:4624-30.

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.

Saeter G, Wiebe T, Wiklund T, et al. Chemotherapy in osteosarcoma. The Scandinavian Sarcoma Group experience. **Acta Orthop Scand Suppl** 1999; 285:74-82.

Sato K, Moriyama M, Mori S, et al. An immunohistologic evaluation of C-erbB-2 gene product in patients with urinary bladder carcinoma. **Cancer** 1992; 70:2493-8.

Scheel C, Schaefer KL, Jauch A, et al. Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas. **Oncogene** 2001; 20:3835-44.

Seo JB, Im JG, Goo JM, Chung MJ, Kim MY. Atypical pulmonary metastases: spectrum of radiologic findings. **Radiographics** 2001; 21:403-17.

Serra M, Scotlandi K, Manara MC, et al. Analysis of P-glycoprotein expression in osteosarcoma. **Eur J Cancer** 1995; 31A:1998-2002.

Serra M, Maurici D, Scotlandi K, et al. Relationship between P-glycoprotein expression and p53 status in high-grade osteosarcoma. **Int J Oncol** 1999; 14:301-7.

Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. **Eur J Cancer** 1997; 33:787-91.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science** 1987; 235:177-82.

Sim FH, Cupps RE, Dahlin DC, Ivins JC. Postradiation sarcoma of bone. **J Bone Joint Surg Am** 1972; 54:1479-89.

Smeland S, Muller C, Alvegard TA, et al. 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.

Smith MEF, Pignatelli M. The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catenin complex. **Histopathology** 1997; 31:107-11.

Sobin LH, Wittekind Ch. **TNM classificação dos tumores malignos**. 5 ed. Trad. de INCA. Rio de Janeiro: INCA; 1998. Tumores de ossos e partes moles: ossos. p.108-12.

Sobin LH, Wittekind Ch. **TNM classification malignant tumors**. 6 ed. New York: John Wiley & Sons; 2002. Tumors of bone and soft tissues; p.109-13.

Souhami RL, Craft AW, Van der Eijken JW, et al. Randomised trial of two regimens of chemotherapy in operable osteosarcoma: a study of the European Osteosarcoma Intergroup. **Lancet** 1997; 350:911-7.

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.

Staddon AP, Lackman R, Robinson K, Shrager JB, Warhol M. Osteogenic sarcoma presenting with lung metastasis. **Oncologist** 2002; 7:144-53.

Stewart DJ, Benjamin RS, Zimmerman S, et al. Clinical pharmacology of intraarterial cis-diamminedichloroplatinum(II). **Cancer Res** 1983; 43:917-20.

Sweetnam R, Knowelden J, Seddon H. Bone sarcoma: treatment by irradiation, amputation, or a combination of the two. **Br Med J** 1971; 2:363-7.

Sztan M, Papai Z, Szendroi M, Looij M, Olah E. Allelic Losses from Chromosome 17 in Human Osteosarcomas. **Pathol Oncol Res** 1997; 3:115-20.

Tanaka MH, Panna V, Chung WT, Lopes A. Tumores malignos dos ossos. **Arq Cat Med** 1997; 26:18-21.

Taylor WF, Ivins JC, Pritchard DJ, Dahlin DC, Gilchrist GS, Edmonson JH. Trends and variability in survival among patients with steosarcoma: a 7-year update. **Mayo Clin Proc** 1985; 60:91-104.

Tsai CM, Chang KT, Perng RP, et al. Correlation of intrinsic chemoresistance of non-small-cell lung cancer cell lines with HER-2/neu gene expression but not with ras gene mutations. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:897-901.

Ueda Y, Dockhorn-Dworniczak B, Blasius S, et al. Analysis of mutant P53 protein in osteosarcomas and other malignant and benign lesions of bone. **J Cancer Res Clin Oncol** 1993; 119:172-8.

Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, et al. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin 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.

Varner JA, Cheresh DA. Integrins and cancer. **Curr Opin Cell Biol** 1996; 8:724-30.

van Es JH, Giles RH, Clevers HC. The many faces of the tumor suppressor gene APC. **Exp Cell Res** 2001; 264:126-34.

Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. **Semin Cancer Biol** 1999; 9:211-20.

Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R. Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. **J Clin Pathol** 2000; 53:374-81.

Wei Y, Fabre M, Branchereau S, Gauthier F, Perilongo G, Buendia MA. Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. **Oncogene** 2000; 19:498-504.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell** 1995; 81:323-30.

Weiner MA, Harris MB, Lewis M, et al. Neoadjuvant high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for the management of patients with nonmetastatic osteosarcoma. **Cancer Treat Rep** 1986; 70:1431-2.

Wick MR, Siegal GP, Unni KK, McLeod RA, Greditzer HG, 3rd. Sarcomas of bone complicating osteitis deformans (Paget's disease): fifty years'experience. **Am J Surg Pathol** 1981; 5:47-59.

Winkler K, Beron G, Kotz R, et al. Adjuvant chemotherapy in osteosarcoma - effects of cisplatin, BCD, and fibroblast interferon in sequential combination with HD-MTX and adriamycin: preliminary results of the COSS 80 study. **J Cancer Res Clin Oncol** 1983; 106 Suppl:1-7.

Winkler K, Beron G, Kotz R, et al. 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, et al. Neoadjuvant chemotherapy of osteosarcoma: results of a randomized 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, et al. Effect of intraarterial 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, et al. Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. **Am Fam Physician** 2002; 65:1123-32.

Wunder JS, Czitrom AA, Kandel R, Andrulis IL. Analysis of alterations in the retinoblastoma gene and tumor grade in bone and soft-tissue sarcomas. **J Natl Cancer Inst** 1991; 83:194-200.

Wunder JS, Bull SB, Aneliunas V, et al. MDR1 gene expression and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. **J Clin Oncol** 2000; 18:2685-94.

Yamaguchi H, Nojima T, Yagi T, et al. The alteration in the pattern of pulmonary metastasis with adjuvant chemotherapy in osteosarcoma. **Int Orthop** 1988; 12:305-8.

Yamaguchi T, Toguchida J, Yamamuro T, et al. Allelotype analysis in osteosarcomas: frequent allele loss on 3q, 13q, 17p, and 18q. **Cancer Res** 1992; 52:2419-23.

Yang Y, Takeuchi S, Tsukasaki K, et al. Methylation analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in adult T-cell leukemia/lymphoma. **Leuk Res** 2005; 29:47-51.

Yokoyama R, Schneider-Stock R, Radig K, Wex T, Roessner A. Clinicopathologic implications of MDM2, p53 and K-ras gene alterations in osteosarcomas: MDM2 amplification and p53 mutations found in progressive tumors. **Pathol Res Pract** 1998; 194:615-21.

Yu D, Hung MC. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. **Oncogene** 2000; 19:6115-21.

***ANEXOS***

---

**Anexo 1 - Ficha de levantamento de dados**

1. NUMERO.....|\_|\_|\_|
2. NOME: .....
3. RGH:.....|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|
4. IDADE.....|\_|\_|
5. SEXO: |1| MASCULINO, |2| FEMININO.....|\_|
6. RAÇA: |1| BRANCA, |2| NEGRA, |3| PARDA, |4| AMARELA.....|\_|\_|
7. DATA DO DIAGNÓSTICO.....\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
8. LOCAL DO TUMOR PRIMÁRIO: |1| FEMUR |2| UMEMO |3| FIBULA |4| TIBIA  
|5| MANDIBULA |6| ILIACO |7| RADIO  
|8| ULNA.....|\_|\_|
9. ESTADIO CLINICO T: |1|T1, |2| T2, |3| TX.....|\_|
10. ESTADIO CLINICO N: |0| N0, |1| N1.....|\_|
11. ESTADIO CLINICO M: |0| M0, |1| M1.....|\_|
12. FOSFATASE ALCALINA.....|\_|\_|\_|
13. DHL.....|\_|\_|\_|
14. TIPO HISTOLOGICO:  
|1| CONDROBLASTICO |2|OSTEOGENICO, |3| TELEANGECTASICO,  
|4| OSTEOCONDROBLASTICO, |5| OSTEOFIBROBLASTICO |6|  
INDETERMINADO|7| PAROSTEAL .....|\_|\_|
15. NUMERO DA BIOPSIA PRÉ.....|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|
16. DATA INICIO QT.....\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
17. TIPO QT NEOADJUVANTE:  
|1| QTIA com CDDP+ Cisplatina IV +Doxorrubicina +, |2| QTIV com CDDP +  
Doxorrubicina + HDMTX |, |3| QTIV com CDDP + Doxorrubicina+ Ifosfamida e VP16, |4|  
QT CDDP IV + Carboplatina+ Doxorrubicina +Ifosfamida + Cisplatina, |5|QT Adria e  
CDDP IV, |6| NÃO FEZ, |7| OUTROS |8| IFO/Doxorrubicina /Cisplatina
18. NUMERO DE CICLOS.....|\_|\_|
19. RESPOSTA CLINICA: |1| COMPLETA, |2|PARCIAL, |3| ESTÁVEL,  
|4| PROGRESSÃO, |5| NÃO AVALIÁVEL.....|\_|
20. TIPO DE CIURGIA: |1| CONSERVADORA, |2| AMPUTAÇÃO.....|\_|
21. DATA DA CIRURGIA.....\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
22. NUMERO AP DA PEÇA.....|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|
23. RESPOSTA HISTOLOGICA (HUVOS):  
|1|GRAU 1, |2|GRAU 2, |3|GRAU 3, |4| GRAU 4, |5|INDETERMINADO.....|\_|
24. TAMANHO DO TU NA PEÇA...(cm).....|\_|\_|



25. METASTASE: |1|SIM |2|NÃO.....|\_|\_|
26. MOMENTO DA META: |1| AO DIAGNÓSTICO |2| SEGUIMENTO.....|\_|\_|
27. NÚMERO DE METASTASE.....|\_|\_|
28. LATERALIDADE: |1| UNILATERAL, |2| BILATERAL.....|\_|\_|
29. DATA DA RESSECÇÃO: .....\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
30. DOENÇA RESIDUAL: |1|SIM, |2| NÃO.....|\_|\_|
31. NUMERO DO AP META:.....|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|
32. DATA DA QT ADJUVANTE:.....\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
33. TIPO DE QT ADJUVANTE:  
 1| QTIA com CDDP+ Cisplatina IV +Doxorrubicina +, |2 QTIV com CDDP + Doxorubicina + HDMTX |, |3| QTIV com CDDP + Doxorubicina+ Ifosfamida e VP16, |4| QT CDDP IV + Carboplatina+ Doxorubicina +Ifosfamida + Cisplatina, | 5|QT Adria e CDDP IV, 6| NÃO FEZ, |7| OUTROS |8| IFO/Doxorrubicina /Cisplatina
34. NUMERO DE CICLOS.....|\_|\_|
35. NEOPLASIA SECUNDÁRIA: |1|SIM, | 2| NÃO.....|\_|\_|
36. CID DA NEOPLASIA SECUNDÁRIA.....|\_|\_|\_|\_|
37. DATA ULTIMO FOLLOW-UP.....\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
38. STATUS: |1|VIVO SEM DOENÇA, |2| VIVO COM DOENÇA, |3|VIVO soe,  
 |4|MOCA, |5| MORTE soe, |6|PV.....|\_|\_|
39. c-erbB-2.....|\_|\_|\_|\_|
40. E-caderina.....|\_|\_|\_|\_|
41. Pan-caderina.....|\_|\_|\_|\_|
42. APC.....|\_|\_|\_|\_|
43. β-catenina.....|\_|\_|\_|\_|

## Anexo 2 - Estadiamento TNM (Classificação Clínica) / 1998.

### **T- Tumor primário**

Tx tumor primário não pode ser medido

T0 Sem evidência de tumor primário

T1 tumor intracortical

T2 tumor invade além da cortical

### **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

### **pTNM Classificação histopatológica**

pT, pN, pM são categorias correspondentes a T,N,M

### **G Grau Histopatológico**

**GX 0 – grau de diferenciação não pode ser avaliado**

**G1 - Bem diferenciado**

**G2- Moderadamente diferenciado**

**G3- Pouco diferenciado**

**G4- Indiferenciado**

### **Agrupamento por Estádio**

Estádio IA	T1	N0	M0	G1 e G2
Estádio IB	T2	N0	M0	G1 e G2
Estádio IIA	T1	N0	M0	G3 e G4
Estádio IIB	T2	N0	M0	G3 e G4
Estádio III	sem definição			
Estádio IVA	Qualquer T	N1	M0	qualquer G
Estádio IVB	Qualquer T	qualquer N	M1	qualquer G