

ESTUDO DE RECEPTORES DE TIROSINA QUINASE EM CORDOMAS

CAROLINA VIEIRA DE CASTRO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Maria Dirlei Ferreira de
Souza Begnami**

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Castro, Carolina Vieira de

Estudo de receptores de tirosina quinase em cordomas /
Carolina Vieira de Castro – São Paulo, 2011.

85p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Descritores: 1. CORDOMA. 2. PROTEÍNAS TIROSINA QUINASES. 3.
CÂNCER. 4. NEOPLASIAS. 5. MARCADORES BIOLÓGICOS. 6.
BIOLOGIA MOLECULAR.

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho:

À Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami pela oportunidade, confiança, paciência, compreensão e ensinamentos.

Ao pessoal do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A C Camargo, em especial ao Dr. Fernando Augusto Soares pela oportunidade e paciência, à Liliane e Gilmara, pela ajuda de sempre e amizade.

Aos participantes da Banca de Qualificação: Dr. Samuel Aguiar Júnior e Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves pelo acompanhamento, pelas críticas e sugestões extremamente valiosas.

Ao Dr. Antônio Hugo Campos pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados.

Ao Dr. Júlio César da Paixão pela oportunidade durante a Iniciação Científica, paciência, conselhos, apoio, compreensão e ensinamentos.

À colega Valéria pelas ajudas sempre que precisei, paciência e ensinamentos.

Às companheiras de laboratório que permitiram a realização deste trabalho, sempre ajudando e apoiando em todos os momentos, em especial à Renatinha pela ajuda nas Imunoistoquímicas, ensinamentos e amizade.

Às amigas que contribuíram para a realização do trabalho, que estiveram presentes nos momentos mais difíceis e pelo incentivo de sempre, Ana Carolina Paterlini, Débora Bassi, Daniele Pires, Paula Chiappini e Tatiana Mendes.

Aos colegas do laboratório de Imunoistoquímica e Hibridização *in situ* Fluorescente de Patologia do Hospital A C Camargo: Ivan, Fátima e Simone pela ajuda de sempre, paciência e amizade.

Às secretárias da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente: Ana Maria Kurinari, Luciana e Vanuza, pelo incentivo na realização deste trabalho e pelas ajudas de sempre.

Ao pessoal da biblioteca da Fundação Antônio Prudente: Jefferson, Francyne e Nicélia pela paciência, eficiência, apóio e amizade. E à Suely Francisco pelos ensinamentos, eficiência, amizade, empenho e ajuda na formatação da dissertação.

Aos funcionários Carlinhos, Sueli e Severino pela dedicação na realização dos TMAs, reações imunoistoquímicas e confecção das lâminas.

Ao pessoal do SAME: Luciano, Odirlei e Paulo pela ajuda e prontidão.

Ao pessoal do arquivo de Anatomia Patológica do Hospital A C Camargo: Glauber e Fábio pela ajuda e paciência.

A todos os meus amigos pelo apoio, incentivo, paciência e ajuda.

À Magda por ter me acolhido em São Paulo e por ter estado ao meu lado em todos os momentos, me incentivando e sempre torcendo por mim.

Ao Felipe pela paciência, carinho, incentivo, apoio, por acreditar e torcer por mim.

Aos meus familiares, especialmente meus pais e meus irmãos por acreditarem em mim, me apoiarem e incentivarem sempre.

RESUMO

Castro CV. **Estudo de receptores de tirosina quinase em cordomas**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Cordomas são neoplasias raras que se desenvolvem a partir de remanescentes da notocorda. Acometem o esqueleto axial, preferencialmente as regiões sacrais e clivais. O tratamento de escolha é a cirurgia, porém muitos pacientes apresentam recidivas devido à dificuldade cirúrgica na excisão total do tumor. Análises moleculares têm demonstrado que receptores de tirosina quinase, como receptores alfa e beta dos fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFR, α e β), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), MET, c-KIT e HER2 estão alterados nos cordomas. Neste estudo, analisamos 58 amostras provenientes de 38 pacientes com cordomas primários e recidivados, e demonstramos que os cordomas ocorrem em ambos os sexos com média de idade de 45 anos. Os cordomas estudados localizaram-se preferencialmente na região sacrococcígea, sendo a cirurgia o principal tratamento. Recidivas foram freqüentes, mas metástases foram raras. Cordomas convencionais com a presença de matriz mixóide e pleomorfismo celular foram os mais encontrados. Através de imunoistoquímica demonstramos que as proteínas PDGFR- α e β , c-MET e AKT fosforilada encontraram-se frequentemente expressas em cordomas. As proteínas HER-2 e EGFR encontraram-se pouco expressas. Para a realização do FISH, analisamos 11 amostras com escore 2 na imunoistoquímica para HER2 e 13 amostras com escore 2 e 3 na imunoistoquímica para EGFR. Foram encontrados 2 casos com polissomias do cromossomo 7, porém não detectamos alterações gênicas de HER-2 ou EGFR. A proteína pAKT esteve mais frequentemente expressa em cordomas primários, e PDGFR- α , em cordomas recidivados. Aparentemente a expressão de pAKT está diretamente associada a piores taxas de sobrevida em 5 anos dos pacientes com cordomas nas análises univariadas.

SUMMARY

Castro CV. **[Study of receptors tyrosine kinase in chordomas]**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Chordoma are rare neoplasms arising from notochordal remnants. The most common sites are the skull base and the sacrococcygeal region. The treatment of choice is surgery, although many patients present recurrence due the difficulty of total excision of the tumor. Molecular analysis have shown that receptors tyrosine kinase as Platelet-derived Growth Factor Receptor- α and β (PDGFR- α and β), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), MET, c-KIT and HER2 are altered in chordomas. In this study, we analysed 58 primary and recurrent chordoma samples from 38 patients, and demonstrated that chordomas occur in both sexes with an average age of 45 years. They preferentially located in the sacrococcygeal region, and the surgery was the treatment of choice. Recurrence was frequently but metastasis was rare. Conventional chordomas with myxoid stroma and cellular pleomorphism were the most common. Through immunohistochemistry we demonstrated that PDGFR- α and β , c-MET and phosphorylated AKT were often expressed in chordomas. HER-2 and EGFR proteins were little expressed. To perform FISH, we analysed 11 samples with score 2 in immunohistochemistry for HER2 and 13 samples with scores 2 and 3 in immunohistochemistry for EGFR. Two chromosome 7 polysomes were found by FISH, but genetic alterations of HER2 or EGFR was not detected. pAKT protein was more frequently expressed in chordomas, and PDGFR- α , in recurrent chordomas. Apparently the expression of pAKT is directly associated with poorer survival rates at 5 years of patients with chordomas in univariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo da localização celular do receptor de Tirosina Quinase.....	10
Figura 2	Esquema representativo da via de sinalização de PI3K/AKT....	11
Figura 3	Esquema representativo da localização celular de ERbB/HER2 (EGFR e HER2).....	14
Figura 4	Características histológicas das amostras de cordoma.....	39
Figura 5	Figuras representativas de imunoistoquímica para os marcadores c-KIT, pAKT, PDGFR- α e β	47
Figura 6	Figuras representativas de imunoistoquímica para os marcadores c-MET, c-erbB-2 e EGFR.....	48
Figura 7	FISH para a pesquisa do estatus do gene EGFR.....	58
Figura 8	FISH para a pesquisa do estatus do gene HER2.....	58
Figura 9	Gráfico representativo da sobrevida global dos pacientes.....	62
Figura 10	Curvas de sobrevida global dos pacientes com cordoma em relação à expressão imunoistoquímica de AKT fosforilada.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Localização e tipo de tratamento realizado nos pacientes com cordomas.....	26
Tabela 2	Tipo de tratamento realizado nos pacientes com cordomas.....	26
Tabela 3	Anticorpos utilizados na imunoistoquímica.....	29
Tabela 4	Sondas utilizadas no FISH.....	30
Tabela 5	Características histopatológicas dos cordomas primários.....	38
Tabela 6	Características histopatológicas dos cordomas recidivados.....	38
Tabela 7	Correlações entre as características histológicas e tumor primário e recidivado.....	41
Tabela 8	Resultado dos marcadores estudados por imunoistoquímica...	45
Tabela 9	Correlações entre as expressões dos marcadores na IHQ e tumores primários e recidivados.....	54
Tabela 10	Resultados de FISH para a pesquisa do estatus do gene HER2.....	57
Tabela 11	Análise univariada dos parâmetros clínicos e histopatológicos em relação à sobrevida global em 5 anos dos pacientes com cordomas.....	62
Tabela 12	Taxas de sobrevida global em 5 anos dos pacientes em relação às expressões das proteínas estudadas por imunoistoquímica.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

DAB	do inglês, Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAPI	do inglês, Diamidino phenylindole
EDTA	do inglês, Ethylene diamine tetra acetic acid
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico do inglês, Epidermal Growth Factor Receptor
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente do inglês, Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
GIST	Tumor Estromal Gastrointestinal do inglês, Gastrointestinal Stromal Tumor
HRP	do inglês, Horse Radish Peroxidase
IHQ	Imunoistoquímica do inglês, Immunohistochemistry
LMC	Leucemia Mielóide Crônica do inglês, Leukemia Myeloid Chronic
n	número de casos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	do inglês, Phosphate Buffered Saline
PDGFR α	Receptor alfa do fator de crescimento derivado das plaquetas do inglês, Platelet-derived Growth Factor Receptor- α
PDGFR β	Receptor beta do fator de crescimento derivado das plaquetas. do inglês, Platelet-derived Growth Factor Receptor- β
RTKs	Receptores de Tirosina Quinase do inglês, Receptor Tyrosine Kinases
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
TMA	do inglês, <i>tissue microarray</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos Gerais	2
1.2	Características Histopatológicas	5
1.3	Tratamento	7
1.4	Alterações Moleculares	8
1.4.1	PDGFR, alfa e beta e c-KIT	12
1.4.2	EGFR e HER2	14
1.4.3	c-MET	16
2	JUSTIFICATIVA.....	18
3	OBJETIVOS	20
4	MATERIAL E MÉTODO	22
4.1	Seleção dos pacientes	23
4.4.1	Caracterização da amostra.....	25
4.2	Construção do Tissue Microarray (TMA).....	27
4.3	Ensaio Imunoistoquímico no Tissue Microarray.....	27
4.4	Ensaio Imunoistoquímico em Cortes Convencionais	29
4.5	Hibridização in situ fluorescente – FISH	30
4.6	Análise das Expressões Imunoistoquímicas.....	30
4.7	Avaliação das Alterações Gênicas por FISH	32
4.7.1	EGFR	32
4.7.2	HER2	33
4.8	Análises Estatísticas.....	33
5	RESULTADOS.....	35
5.1	Características Histopatológicas	36

5.2	Correlações das características histopatológicas dos cordomas primários e recidivados.....	40
5.3	Resultados das Expressões Imunoistoquímicas	42
5.3.1	c-KIT	42
5.3.2	pAKT	42
5.3.3	PDGFR- α	42
5.3.4	PDGFR- β	43
5.3.5	c-MET	43
5.3.6	c-erbB-2.....	44
5.3.7	EGFR	44
5.4	Correlações entre os marcadores e Tumores Primários e Recidivados	49
5.4.1	c-KIT	49
5.4.2	pAKT	49
5.4.3	PDGFR- α	50
5.4.4	PDGFR- β	50
5.4.5	c-MET	51
5.4.6	c-erbB-2.....	52
5.4.7	EGFR	53
5.5	FISH	55
5.5.1	EGFR	56
5.5.2	HER2.....	57
6	ANÁLISES DE SOBREVIDA	59
6.1	Variáveis clínicas e histológicas	60
6.1.1	Análise Univariada.....	60
6.2	Análises dos marcadores	63
6.2.1	Análise Univariada.....	63
7	DISCUSSÃO	67
8	CONCLUSÃO.....	75

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77

ANEXOS

- Anexo 1** Construção do TMA
- Anexo 2** Protocolo de Técnica de Imunoistoquímica
- Anexo 3** Protocolo de Técnica de FISH
- Anexo 4** Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em
Pesquisa do Hospital A C Camargo.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

Cordomas são neoplasias raras, possuem uma incidência de aproximadamente 0,1/100.000 habitantes por ano e representam cerca de 1 a 4% dos tumores ósseos. São tumores derivados de remanescentes da notocorda (MIRRA et al. 2002; CASALI et al. 2004; BHADRA e CASEY 2006; BISCEGLIA et al. 2007; YANG H et al. 2009; YANG XR et al. 2009; FERRARESI et al. 2010; UNNI e INWARDS 2010; WALTER et al. 2011).

Acometem o esqueleto axial, preferencialmente as regiões sacrais e clivais. São tumores de crescimento lento e pouco delimitados quando acometem os ossos, mas geralmente apresentam uma pseudo-cápsula quando presentes em partes moles. Acometem pacientes entre 40-80 anos, sendo mais comuns em adultos após os 60 anos, e, eventualmente, podem acometer crianças e adolescentes, principalmente na região do crânio. É mais freqüentemente encontrado em indivíduos do sexo masculino (2:1) (HEFFELFINGER et al. 1973; BURGER e SCHEITHAUER 1994; MIRRA et al. 2002; BHADRA e CASEY 2006; BISCEGLIA et al. 2007; CASALI et al. 2007; CHUGH et al. 2007; MURO et al. 2007; YANG H et al. 2009; HORBINSKI et al. 2010).

O prognóstico relacionado aos cordomas é dependente principalmente do tamanho e da localização das lesões. Os cordomas

acometem o sacro em 50-60% dos casos; a base do crânio entre 25-35%; a região cervical em 10% e a região lombar em 5% dos casos (MIRRA et al. 2002; CASALI et al. 2004; BRANDAL et al. 2005; UNNI et al. 2005; BHADRA e CASEY 2006; BISCEGLIA et al. 2007; CHUGH et al. 2007; FERRARESI et al. 2010; UNNI e INWARDS 2010).

Esta neoplasia é caracteristicamente uma massa de crescimento lento, não produzindo sintomas específicos por meses ou anos, dificultando assim o diagnóstico inicial desta doença (MIRRA et al. 2002; HORBINSKI et al. 2010). Na maioria dos casos, o principal sintoma é a dor, seguido pelos déficits neurológicos, que tendem a ser variados de acordo com o tamanho e a localização da lesão (CASALI et al. 2004; CHUGH et al. 2007).

Na região sacrococcígea, o sintoma mais freqüente é a dor na parte inferior da coluna vertebral. Geralmente, os sintomas de compressão podem levar à constipação, e nos casos mais graves, à obstrução intestinal. A grande maioria dos casos se estende para a região pré-sacral, podendo afetar o reto e a bexiga. O exame de toque retal detecta facilmente o tumor. Quando o tumor afeta a bexiga, pode ocorrer alteração urinária. Disfunções neurais, como anestesia, são incomuns, pois estas manifestações são tardias (MIRRA et al. 2002; UNNI et al. 2005; YANG H et al. 2009; UNNI e INWARDS 2010).

As neoplasias localizadas na região esfeno-occipital são freqüentemente associadas à cefaléia crônica, e os sintomas levam à compressão dos pares de nervos cranianos. O envolvimento do nervo ocular é muito freqüente, resultando em diplopia. A compressão e destruição da

glândula pituitária causam distúrbios endócrinos. No caso de infiltração da fossa nasal, pode ocorrer obstrução nasal inferior e sangramento. Pacientes com cordomas acometendo esta área são geralmente uma década mais jovens que os pacientes com cordomas de coluna vertebral ou do sacro (MIRRA et al. 2002; UNNI et al. 2005; WEINBERGER et al. 2005; UNNI e INWARDS 2010).

Cordomas localizados em vértebras cervicais, torácicas e lombares geralmente produzem sintomas relacionados com as raízes nervosas e compressão da medula espinhal. A maioria dos pacientes apresenta sintomas neurológicos: dor progressiva, edema, déficit motor (MIRRA et al. 2002; BISCEGLIA et al. 2007; UNNI e INWARDS 2010).

Apesar do crescimento característico, esta neoplasia possui um importante crescimento expansivo, causando destruição óssea do sítio de origem, seguida de infiltração e invasão de estruturas locais (MURO et al. 2007; LONGONI et al. 2008).

Embora raras, os cordomas podem dar origem a metástases. Os principais sítios são pulmões, osso, fígado, tecidos moles, linfonodos e pele (CASALI et al. 2007; CHUGH et al. 2007; FERRARESI et al. 2010). Entretanto, o maior problema da doença é a recorrência local envolvendo estruturas vitais (McPHERSON et al. 2006; CASALI et al. 2007; FASIG et al. 2008). Epidemiologicamente, a média de sobrevida dos pacientes com cordomas tem sido estimada em aproximadamente 6 anos, com uma média de sobrevida de 70% em 5 anos, e 40% para 10 anos (BARATTI et al. 2003; CASALI et al. 2004).

1.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Os cordomas são histologicamente caracterizados pela presença de células fisalíferas, que são células claras vacuolizadas, positivas para S100 e citoceratinas. São divididos em 3 subtipos histológicos: convencional, condróide e desdiferenciado (PEÑA et al. 1970; MIRRA et al. 2002; BARATTI et al. 2003; CASALI et al. 2004; BRANDAL et al. 2005; UNNI et al. 2005; TAMBORINI et al. 2006; BISCEGLIA et al. 2007; CHUGH et al. 2007; FERRARESI et al. 2010).

Os cordomas convencionais ou clássicos caracteristicamente apresentam crescimento de padrão lobular. As células tumorais são separadas por bandas fibrosas e dispostas em arranjos foliáceos, ou isoladas em meio a estroma mixóide. Apresentam vacúolos pálidos no citoplasma e, discreta ou moderada atipia nuclear. Mitoses não são freqüentes. Entretanto, outras características histológicas menos comuns podem ser encontradas, como a presença de áreas mais celulares constituídas por células fusiformes, células em anéis de sinete, células com citoplasma amplo eosinofílico e/ou epitelióide sugerindo características hepatóides. Podem ser vistas ainda áreas com moderado pleomorfismo celular e escassa matriz mixóide (BISCEGLIA et al. 2007).

Os cordomas condróides apresentam as mesmas características histopatológicas dos cordomas convencionais, porém exibem áreas com matriz mixóide densa que se assemelham à cartilagem hialina, por vezes com metaplasia cartilaginosa verdadeira. É encontrado quase que

exclusivamente na região da base do crânio, e são muito raros na região da coluna vertebral e do sacro (MEIS et al. 1987; WOJNO et al. 1992; BURGER e SCHEITHAUER 1994; CASALI et al. 2004, 2007; UNNI et al. 2005; BISCEGLIA et al. 2007).

Os cordomas desdiferenciados ou sarcomatosos caracterizam-se pela presença de áreas de transformação sarcomatosa em um cordoma convencional ou condróide. Estas áreas de transformação apresentam características histológicas de um sarcoma de alto grau com presença de células fusiformes atípicas, e acometem menos de 5% dos pacientes. A maioria dos cordomas desdiferenciados se desenvolve na região do sacro, embora alguns casos tenham sido descritos envolvendo a região da base do crânio (BURGER e SCHEITHAUER 1994; CASALI et al. 2004; 2007; UNNI et al. 2005; BISCEGLIA et al. 2007).

1.3 TRATAMENTO

O principal tratamento dos cordomas é a cirurgia (MIRRA et al. 2002; BHADRA e CASEY 2006; CASALI et al. 2007; CHUGH et al. 2007; FASIG et al. 2008; YANG H et al. 2009; FERRARESI et al. 2010). Porém, devido à localização peculiar, próxima de estruturas vitais, o tratamento cirúrgico tem se mostrado ineficaz. O tipo de ressecção (total ou parcial) está diretamente associado ao prognóstico dos pacientes. A taxa de recorrência do tumor nos casos de ressecção marginal é em torno de 70%. Portanto, as taxas de cura cirúrgica destas neoplasias ainda são baixas (BARATTI et al. 2003; CASALI et al. 2004; 2007; BRANDAL et al. 2005; FERRARESI et al. 2010; HORBINSKI et al. 2010; WALTER et al. 2011).

Em relação ao prognóstico dos pacientes operados, a expectativa de vida em 10 anos para lesões de localização sacral é em torno de 50%, e para tumores de regiões da base do crânio em cerca de 30%. Esses pacientes geralmente são submetidos a cirurgias consecutivas durante o curso da doença (CASALI et al. 2007). A média de sobrevida dos pacientes com metástases tem sido reportada em torno de 12 meses (CASALI et al. 2004).

O tratamento radioterápico tem sido indicado nos tumores irresssecáveis ou com localizações de difícil acesso cirúrgico. Os cordomas são considerados tumores radorresistentes, e ainda há controvérsias em relação à quantidade exata de energia que deve ser utilizada no tratamento (McPHERSON et al. 2006; CASALI et al. 2007; CHUGH et al. 2007;

FERRARESI et al. 2010; WALTER et al. 2011). Entretanto, a radioterapia adjuvante é para muitos autores o melhor tratamento para a sobrevida a longo prazo (FORSYTH et al. 1993; HUG e SLATER 2000; CASALI et al. 2007; FASIG et al. 2008). Além disso, este tratamento tem oferecido benefícios temporários no controle local da doença (CASALI et al. 2007; CHUGH et al. 2007; FERRARESI et al. 2010).

Os cordomas não são sensíveis à quimioterapia. Este tipo de tratamento tem sido utilizado somente em pacientes com tumores desdiferenciados, que representam menos de 5% de todos os cordomas (FLEMING et al. 1993; CASALI et al. 2004; MCPHERSON et al. 2006; CHUGH et al. 2007; WALTER et al. 2011).

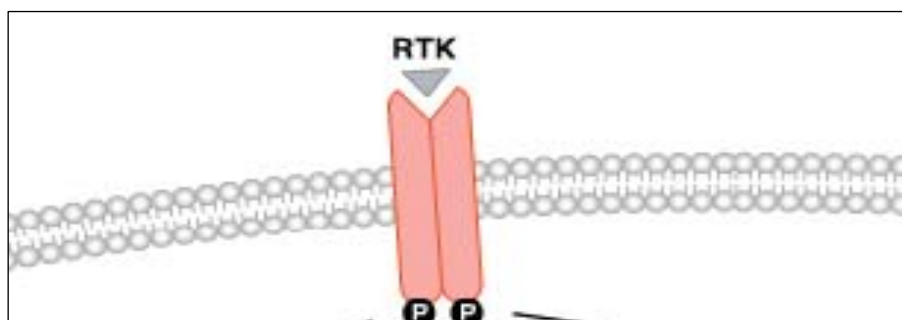
1.4 ALTERAÇÕES MOLECULARES

Os fatores etiológicos associados aos cordomas ainda são desconhecidos e pouco se sabe a respeito da biologia molecular associada a esses tumores (CROCKARD et al. 2001; BRANDAL et al. 2005; WEINBERGER et al. 2005; TAMBORINI et al. 2006; MITELMAN et al. 2010). Vários estudos genéticos sobre cordomas têm sido realizados, incluindo análises cromossômicas, instabilidade de microssatélites, perdas de heterozigosidade e estudos de clonagem (KELLEY et al. 2001; CHUGH et al. 2007). Entretanto, estes estudos mostram resultados imprecisos e conflitantes (KERR et al. 1975; DALPRÀ et al. 1999; MIOZZO et al. 2000; KELLEY et al. 2001; WEINBERGER et al. 2005).

Estudos sobre identificação de marcadores moleculares que tenham importância prognóstica em cordomas tem sido alvo de interesse de vários pesquisadores nos últimos anos (HORBINSKI et al. 2010; TAMBORINI et al. 2010).

Alguns estudos anteriores demonstraram que receptores de tirosina quinase (RTKs; *do inglês, Receptor Tyrosine Kinases*) como os receptores alfa e beta dos fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR, alfa e beta; *do inglês, Platelet-derived Growth Factor Receptor- α e Platelet-derived Growth Factor Receptor- β*), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, *do inglês, Epidermal Growth Factor Receptor*), e c-MET estão freqüentemente expressos e ativados nos cordomas (CASALI et al. 2004; BURGER et al. 2005; TAMBORINI et al. 2006; DOBASHI et al. 2007; CHUGH et al. 2007; FASIG et al. 2008; NAKA et al. 2008, 2009; FERRARESI et al. 2010; HORBINSKI et al. 2010; TAMBORINI et al. 2010; WALTER et al. 2011). A relação desses receptores com desenvolvimento e progressão desta neoplasia vem sendo descrita por alguns autores (CASALI et al. 2004; BURGER et al. 2005; WEINBERGER et al. 2005; TAMBORINI et al. 2006; CHUGH et al. 2007; DOBASHI et al. 2007; FASIG et al. 2008; LONGONI et al. 2008; NAKA et al. 2008; SINGHAL et al. 2009; FERRARESI et al. 2010; HORBINSKI et al. 2010; TAMBORINI et al. 2010). A presença de mutação de gene c-KIT também tem sido demonstrada em vários cordomas (CASALI et al. 2004; TAMBORINI et al. 2006; FERRARESI et al. 2010; TAMBORINI et al. 2010).

Receptores de tirosina quinase são proteínas transmembranas, que possuem um domínio externo ao qual o fator de crescimento se liga, e um domínio citoplasmático capaz de ativar a cascata de sinalização intracelular, promovendo a proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e apoptose. Esquema representativo pode ser visto na Figura 1. Alterações estruturais ou aumento da produção desses receptores têm sido identificados em alguns tumores, resultando na ativação da proliferação celular, mesmo na ausência de estímulo extracelular, e à transformação maligna (SNITCOVSKY e BRENTANI 2003; BURGER et al. 2005; LAGONIGRO et al. 2006).

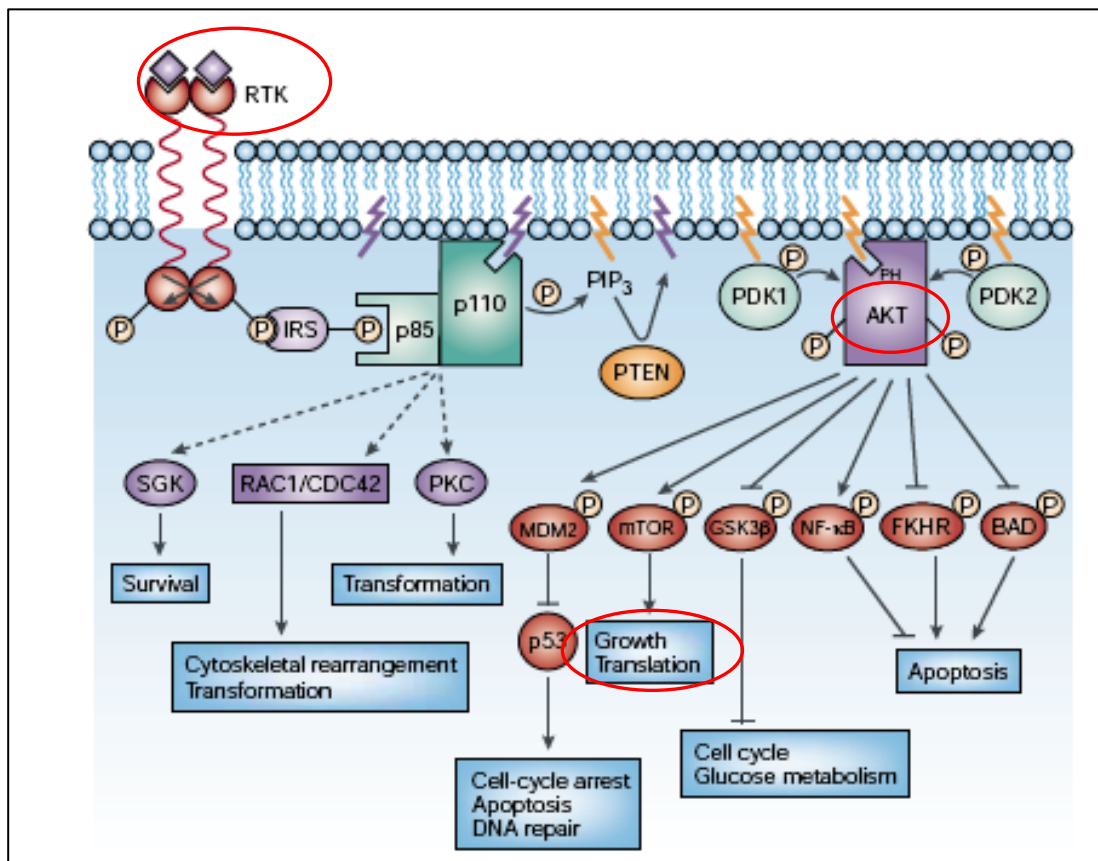


Fonte: Modificado de <http://www.cellsignal.com/pathways/tyrosine.jsp>

Figura 1 - Esquema representativo da localização celular do receptor de Tirosina Quinase

Os receptores de tirosina quinase têm sido alvos de estudo devido a duas principais razões: mais de 50% de receptores de tirosina quinase estão mutados ou alterados estruturalmente em neoplasias e, inibidores dos receptores de tirosina quinase vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de bloquear a atividade das proteínas quinases desreguladas, retardando assim, a progressão do tumor (LAGONIGRO et al. 2006).

A via PI3K/AKT tem sido extensivamente estudada pelos pesquisadores em busca de novas drogas capazes de inativar esta via ou os genes associados. Sabe-se que a presença dos receptores de tirosina quinase ativados em cordomas, leva à ativação de transdutores secundários pertencentes à via MAPK ou PI3K/AKT, que juntos irão ativar o m-TOR, promovendo o crescimento e a proliferação celular (TAMBORINI et al. 2010). Esta via de sinalização está representada na Figura 2.



Fonte: Modificado de FASOLO e SESSA 2008

Figura 2 - Esquema representativo da via de sinalização de PI3K/AKT

1.4.1 PDGFR, alfa e beta e c-KIT

O receptor de tirosina quinase c-KIT é uma oncoproteína cujo principal ligante é o fator de células-tronco (SCF, do inglês, *stem cell factor*) ou ligante de KIT. Esta oncoproteína é o alvo primário do Imatinib® no tratamento de tumores estromais gastrointestinais (BURGER et al. 2005).

O PDGF é um mitógeno potente para as células mesenquimais. É produzido principalmente por megacariócitos, os quais se tornam multinucleados e incapazes de proliferar durante a diferenciação. A liberação parácrina de PDGF é limitada e a linhagem de células produtoras é destruída, impedindo uma produção excessiva de PDGF (SNITCOVSKY e BRENTANI 2003).

Segundo TAMBORINI et al. (2010), a ativação de PDGFR se dá pelo ciclo autócrino, embora os autores tenham observado alguns casos de pacientes com amplificação gênica sugerindo que outros mecanismos possam ser responsáveis pela desregulação de PDGFR beta em cordomas. Em relação ao PDGFR alfa, os mesmos autores sugeriram que este deve ser ativado pelos ciclos autócrinos e parácrinos.

A utilização do Imatinib®, como inibidor de PDGFR beta e c-KIT, tem sua eficácia comprovada em tratamentos de outros tumores como: leucemia mielóide crônica (LMC, do inglês, *Leukemia Myeloid Chronic*) e tumores estromais gastrointestinais (GIST, do inglês, *Gastrointestinal Stromal Tumor*). Em células *in vitro* de dermatofibrossarcoma *protuberans*, a atividade inibitória de Imatinib® na ativação de PDGFR beta também já foi comprovada (DRUKER et al. 2001; JOENSUU et al. 2001; DEMETRI et al.

2002; VAN OOSTEROM et al. 2002; CASALI et al. 2004; BURGER et al. 2005).

O tratamento com inibidor das tirosinas quinases, PDGFR alfa e beta e c-KIT, em cordomas tem sido sugerido por alguns pesquisadores como um tipo de tratamento opcional, obtendo melhoras clínicas, radiológicas e na qualidade de vida dos pacientes (CASALI et al. 2004; TAMBORINI et al. 2006; LONGONI et al. 2008; SINGHAL et al. 2009; FERRARESI et al. 2010).

TAMBORINI et al. (2006) analisaram a expressão de PDGFR alfa e beta e c-KIT em 31 pacientes com cordomas convencionais e demonstraram que PDGFR alfa e beta e c-KIT aparentemente estão ativados e fosforilados em todos os cordomas, mesmo com diferentes níveis de expressão. CASALI et al. (2004) analisaram a utilização de Imatinib® em 6 pacientes com cordoma, mostrando sucesso parcial no tratamento, pois observaram melhoras clínicas, entretanto não houve controle do crescimento do tumor em todos os casos tratados. FERRARESI et al. (2010) demonstraram os benefícios deste tratamento em cordomas irresssecáveis ou metastáticos.

As expressões imunoistoquímicas de c-KIT e PDGFR em cordomas estão geralmente presentes, porém o uso de Imatinib® nestes tumores tem sido ineficiente e aparentemente está associado à presença ou não de mutações desses genes (BURGER et al. 2005).

Os inibidores de EGFR e HER2 (Gefinitib e Erlotinib) têm sido utilizados no tratamento de diversos tumores sólidos, como os carcinomas de mama, pulmão e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (WEINBERGER et al. 2005; DOBASHI et al. 2007). Anticorpos monoclonais como Cetuximab e Panitumumab têm sido utilizados no tratamento de carcinoma de cólon e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (DOBASHI et al. 2007). Segundo DANIELE et al. (2007), em carcinoma não pequenas células do pulmão, a análise da mutação de EGFR é um excelente preditor na resposta ao tratamento com inibidores de tirosina quinase.

Recentemente alguns autores relataram o benefício da terapia com os inibidores de EGFR, Gefitinib e Cetuximab, em cordomas. HOF et al. (2006) relataram a eficácia do tratamento de um paciente com cordoma recorrente com o uso da combinação dos dois inibidores. LINDÉN et al. (2008) reportaram a regressão de um cordoma cervical em um paciente tratado com as mesmas drogas.

O tratamento com outro inibidor de EGFR, o Erlotinib, também foi sugerido por SINGHAL et al. (2009) que relataram o caso em um paciente que foi inicialmente tratado com Imatinib e não obteve resposta, no entanto, quando o paciente foi submetido ao tratamento com Erlotinib, houve uma redução significativa de todos os implantes tumorais.

Além disso, WALTER et al. (2011) relataram que pacientes com cordoma frequentemente expressam EGFR e outros receptores de tirosina quinase, sendo estes apontados como possíveis alvos terapêuticos.

1.4.3 c-MET

A oncoproteína c-MET pertence à família de receptores de tirosina quinase e consiste em uma cadeia extracelular (alfa) e uma transmembrana (beta). A cadeia beta contém o domínio tirosina quinase e o sítio para fosforilação da tirosina (OSTROUMOV e HUNTER 2008).

O receptor de tirosina quinase c-MET é principalmente expresso em células epiteliais e possui uma alta afinidade com o fator de crescimento hepático (HGF/SF) atuando tanto no desenvolvimento normal quanto no crescimento de tumores e metástases. A alteração de sinalização de HGF/c-MET em cordomas representa um papel importante no potencial maligno desta neoplasia, especialmente em recorrências, e pior prognóstico (OSTROUMOV e HUNTER 2008). Esta alteração no papel de c-MET sugere que a oncoproteína tenha papéis variáveis de acordo com o estágio clínico da doença (FORSYTH et al. 1993; FURUKAWA et al. 1995; RUCO et al. 1996; TERADA et al. 1998; HUG e SLATER 2000; AISHIMA et al. 2002; OSTROUMOV e HUNTER 2008; NAKA et al. 2008, 2009).

Alguns estudos relataram que a sinalização de c-MET é uma característica importante para muitos tecidos, incluindo o câncer, e o marcador tem sido apontado como importante alvo das terapias genéticas. Entretanto, para que o tratamento seja efetivo, este deve atuar contra atividade de c-MET e bloquear a sinalização do HGF, simultaneamente. A terapia promoverá a morte das células tumorais, além de oferecer um melhor prognóstico para pacientes com tumores irresssecáveis (MAZZONE e COMOGLIO 2006; OSTROUMOV e HUNTER 2008).

Portanto, concluímos que ainda não há consenso em relação à expressão dos receptores de tirosina quinase nos cordomas, bem como a sua influência no prognóstico dos pacientes. Diante deste cenário, este trabalho tem como objetivo analisar o padrão de expressão dos receptores de tirosina quinase nos cordomas dos pacientes diagnosticados no Hospital A C Camargo, e estabelecer possíveis correlações com os dados clínicos e histopatológicos.

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Os cordomas, embora raros, e de evolução lenta, apresentam prognóstico sombrio devido principalmente às recidivas tumorais freqüentes. As opções terapêuticas são limitadas e principalmente cirúrgicas. A descoberta de alterações moleculares associadas a estas neoplasias poderá contribuir para a seleção terapêutica adequada para estes pacientes. Neste contexto, o estudo dos receptores de tirosina quinase em cordomas da nossa Instituição, poderá nos fornecer informações importantes em relação à participação destas moléculas na evolução e tratamento destas neoplasias.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho são:

1. Estudar as expressões imunoistoquímicas das proteínas PDGFR alfa e beta, c-KIT, c-MET, AKT fosforilada, HER2 e EGFR, nos cordomas diagnosticados no Hospital A C Camargo;
2. Estudar o estatus do gene HER2 e EGFR através de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) nos cordomas diagnosticados no Hospital A C Camargo;
3. Determinar as principais características demográficas e histopatológicas dos cordomas diagnosticados no Hospital A C Camargo no período de 1980 a 2006;
4. Selecionar possíveis marcadores prognósticos dentre as variáveis clínicas, histopatológicas e de padrão de expressão imunoistoquímica dos receptores de tirosina quinase estudados.
5. Estabelecer possíveis diferenças entre os cordomas primários e recidivados em relação às características clínicas, histopatológicas e de expressão dos receptores de tirosina quinase.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram pesquisados todos os casos com o diagnóstico de cordoma registrados no Banco de dados do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo no período de 1980 a 2006. Foram encontrados 93 casos com o diagnóstico de cordoma.

Para este estudo foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: diagnóstico de cordoma confirmado através de exame histopatológico, bloco de parafina disponível nos arquivos de anatomia patológica do Hospital AC Camargo, contendo material suficiente para as análises histopatológicas de imunoistoquímica e FISH. O critério de exclusão adotado foi tratamento quimio ou radioterápico prévio ou concomitante por outro tipo de neoplasia. De acordo com os critérios de inclusão e exclusão, do total de 93 casos iniciais com o diagnóstico de cordoma, 35 foram excluídos pela falta de material representativo para as análises. Portanto, a casuística final foi constituída por 58 amostras de cordomas. Estas amostras eram representadas por cordomas primários e recidivados de 38 pacientes.

As variáveis clínico-patológicas como idade, gênero, localização do tumor, tipo de tratamento submetido e recidivas ou metástases, foram obtidas a partir de revisão de prontuários junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) da Instituição e catalogados em um banco de dados.

Os parâmetros histopatológicos como subtipo histológico, presença de necrose, atipia celular, matriz mixóide e atividade mitótica, foram obtidos a partir de revisão das lâminas dos casos selecionados para o estudo. A revisão foi realizada em microscópio óptico comum por um patologista (MDFSB). O subtipo histológico do tumor foi determinado de acordo com a Classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) em convencional, condróide ou desdiferenciado. Foi considerado cordoma convencional aqueles que apresentavam as células tumorais separadas por bandas fibrosas e dispostas em arranjos foliáceos, ou isoladas em meio a estroma mixóide e foi considerado cordoma condróide aqueles que apresentavam a matriz mixóide densa. Cordomas desdiferenciados não foram encontrados (MIRRA et al. 2002).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital A.C. Camargo, sob o número 1228/09 em 06/05/2009 (Anexo 4).

4.4.1 Caracterização da amostra

Os dados clínicos dos 38 pacientes e características histopatológicas estão descritas abaixo.

A média de idade dos pacientes de nossa casuística foi de 45 anos, mínima de 10 meses e máxima de 86 anos, com mediana de 46 anos.

Em relação ao gênero, 19 (50%) pacientes eram do sexo masculino e 19 (50%) pacientes eram do sexo feminino com razão M:F de 1:1.

Quanto à localização do tumor, observou-se um predomínio da região sacrococcígea, representada por 22 (58%) pacientes, seguida da região do

clivus, com 12 (31,5%) pacientes e a região cervical foi representada por 4 (10,5%) pacientes.

Em relação ao tipo de tratamento, 35 (92%) pacientes foram tratados com cirurgia e 3 (8%) pacientes não foram operados. Dos cordomas submetidos ao tratamento cirúrgico (n=35), 22 (58%) só tiveram este tipo de tratamento, 7 (18,4%) casos foram submetidos à radioterapia adjuvante, 3 (7,9%) tiveram a combinação da cirurgia com radioterapia e quimioterapia, e 3 (7,9%) pacientes foram submetidos ao tratamento quimioterápico adjuvante. Dos 3 pacientes não operados, 1 (2,6%) foi submetido ao tratamento radioterápico exclusivo e 2 (5,2%) pacientes não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento. Estes dados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Dentre os 38 pacientes, 5 (13%) deles apresentaram metástases.

Das 58 amostras de cordomas selecionadas, 26 (44,8%) amostras eram tumores primários e 32 (55,2%) amostras eram recidivas tumorais. Dentre as amostras correspondentes às recidivas (n=32), 23 foram recidivas locais e 9 foram em outras localidades.

Tabela 1 - Localização e tipo de tratamento realizado nos pacientes com cordomas.

Variável	Categoria	N (Total =38)	Porcentagem (%)
Localização do tumor	Sacroccígea	22	58
	Clivus	12	31,5
	Cervical	4	10,5
Cirurgia	Sim	35	92
	Não	3	8
Radioterapia	Sim	11	29
	Não	27	71
Quimioterapia	Sim	6	15,8
	Não	32	84,2
Tipo de material	Tumor Primário	26	44,8
	Recidiva	32	55,2

Tabela 2 – Tipo de tratamento realizado nos pacientes com cordomas.

Variável	N (Total =38)	Porcentagem (total 100%)
Cirurgia exclusiva	22	58
Cirurgia + RT	7	18,4
Cirurgia + RT + Qt	3	7,9
Cirurgia + Qt	3	7,9
RT exclusiva	1	2,6
Nenhum tratamento	2	3,4

Legenda: N: número de casos, RT: radioterapia, Qt: quimioterapia.

4.2 CONSTRUÇÃO DO TISSUE MICROARRAY (TMA)

A metodologia utilizada para a construção do bloco de *Tissue Microarray* (TMA) foi detalhadamente descrita por ANDRADE et al. (2007) e encontra-se no anexo (anexo 1).

Os casos selecionados para este estudo foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo e os blocos representativos do tumor foram separados. Novos cortes foram realizados e corados pela técnica de H&E. As áreas mais representativas do tumor foram identificadas por um patologista (MDFSB) através do exame microscópico das lâminas, e as áreas de interesse foram marcadas com caneta permanente e identificadas nos blocos de parafina correspondentes (blocos doadores).

Para o nosso estudo, foi montado um bloco de TMA contendo 58 amostras de cordomas em cilindros de 1mm dispostas em duplicatas. Utilizou-se o dispositivo técnico *Tissue Microarray* (TMA) (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA).

4.3 ENSAIOS IMUNOISTOQUÍMICOS NO TISSUE MICROARRAY

O método utilizado foi o do polímero não biotinilado (Advanced, DAKO). Os passos técnicos utilizados estão no anexo 2. A recuperação antigênica de todos os marcadores foi feita com tampão citrato 10 mM, pH 6,0 em panela de pressão (Eterna[®], Nigro), exceto do marcador PDGFR- β

que foi feita com tampão Tris EDTA 1 mM, pH 9,0 em panela de pressão (Eterna[®], Nigro).

As reações foram realizadas em 2 lâminas do bloco de TMA para cada marcador com níveis de profundidades diferentes de pelo menos 20 cortes de diferença. Esta estratégia garante a observação de áreas distintas da neoplasia. Foram analisados 4 spots por marcador. Alguns deles não foram representados no TMA, portanto foi realizada imunoistoquímica em corte convencional dos casos cujos spots não estavam representados nas lâminas de TMA. Foi observada a expressão de cada marcador no grupo dos tumores primários e das recidivas separadamente.

Os anticorpos pesquisados, clones, origens, diluições, controles positivos e padrões de marcação utilizados podem ser vistos na Tabela 3.

As reações foram acompanhadas de controles positivos, em tecidos sabidamente positivos para os anticorpos testados e controles negativos nos quais os anticorpos primários foram substituídos por imunoglobulinas de mesma origem. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e o critério utilizado para positividade foi estabelecido de acordo com a categorização descrita para cada anticorpo pesquisado.

Tabela 3 - Anticorpos utilizados na imunoistoquímica.

Anticorpos	Clone	Origem	Diluição	Controle	Padrão de Expressão
PDGFR alfa	Policlonal	Neomarkers Upstate	1:50	Ovário	Citoplasmático
PDGFR beta	Policlonal	Biotechnology	1:150	Tonsila	Citoplasmático
EGFR pan	EP38y	Epitomics	1:160	Glioblastoma	Membrana celular
c-erbB-2	Policlonal	DAKO	1:2000	Ca de mama	Membrana celular
CD117 (c-KIT)	Policlonal	DAKO	1:200	GIST	Citoplasmático
pAKT	587F11	Signalling	1:100	Ca de mama Ca de	Citoplasmático Citoplasmático e
c-MET	8F11	Novocastra	1:50	próstata	Membrana

4.4 ENSAIOS IMUNOISTOQUÍMICOS EM CORTES CONVENCIONAIS

Foram utilizados os cortes convencionais nos casos cujos cilindros não estavam suficientemente representados no TMA e que exibiam material suficiente nos blocos de parafina, totalizando 40 amostras.

Para as reações imunoistoquímicas (IHQ) em cortes convencionais, foi utilizado o método do polímero não biotinizado (Advanced, DAKO). Os passos técnicos utilizados foram os mesmos realizados no TMA, exceto a incubação na estufa a 60°C por meia hora, que é feito para retirar a camada protetora de parafina que é mais grossa em cortes de TMA.

4.5 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE – FISH

A técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH, do inglês, *Fluorescent in situ hybridization*) foi realizada seguindo as recomendações do fabricante para pesquisa do gene HER2 e os critérios descritos por DOBASHI et al. (2007), para pesquisa do gene EGFR. O protocolo utilizado para as reações contendo os passos detalhadamente descritos, encontra-se no Anexo 3. As sondas utilizadas estão na Tabela 4.

Tabela 4 - Sondas utilizadas no FISH.

	Sonda	Centrômero	Marca
EGFR	7p12	7	ZytoVision
HER2	17q11.2-12	17	DAKO

4.6 ANÁLISE DAS EXPRESSÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

Para as proteínas de marcação citoplasmática, c-KIT, PDGFR- α , PDGFR- β , c-MET e pAKT, a positividade foi avaliada de acordo com um escore considerando-se a intensidade da marcação e a quantidade de células marcadas (FASIG et al. 2008):

Escore 0 = Nenhuma coloração é observada nas células neoplásicas / ou coloração de fraca intensidade é observada em 10% das células.

Escore 1+ = Coloração de fraca intensidade em pelo menos 10% das células / ou coloração de moderada intensidade em menos de 10% das células.

Escore 2+ = Coloração de moderada intensidade em pelo menos 10% das células / ou forte em menos de 50% das células.

Escore 3+ = Coloração de forte intensidade na maior parte das células.

As proteínas de expressão na membrana, c-MET, HER2 e EGFR, foram avaliadas de acordo com o Sistema de Interpretação Imunoistoquímica da proteína HER2 (WOLFF et al. 2007):

Escore 0 = Nenhuma coloração é observada nas células neoplásicas invasivas.

Escore 1+ = Coloração fraca e incompleta de membrana em qualquer proporção de células neoplásicas invasivas / ou coloração fraca e completa em menos de 10% das células.

Escore 2+ = Coloração completa de membrana que não é uniforme / ou coloração fraca, mas com óbvia distribuição circunferencial em no mínimo 10% das células / ou intensa e completa coloração de membrana em 30% ou menos das células neoplásicas invasivas.

Escore 3+ = Coloração uniforme e intensa da membrana em mais do que 30% das células neoplásicas invasivas.

A proteína c-MET apresentou mais de um padrão de expressão: citoplasmático e de membrana. Estes padrões foram analisados separadamente e considerados como variáveis independentes.

Para as análises das proteínas de marcação citoplasmática, e a proteína c-MET de marcação de membrana foram considerados negativos os casos com escore 0. Os casos com escore 1+ foram considerados

positivos com marcação fraca, escore 2+, positivos com marcação moderada e escore 3+, positivos com marcação forte.

4.7 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GÊNICAS POR FISH

Procedeu-se a leitura das lâminas no microscópio óptico trinocular com fluorescência de mercúrio (OLYMPUS® BX41-FL-III), equipado com objetiva de imersão e filtros adequados. As imagens obtidas foram capturadas com câmera digital colorida refrigerada (5.1 megapixel) acoplada ao microscópio, usando o programa para análise de imagem Image Pro Plus versão 6.0 (OLYMPUS®).

4.7.1 EGFR

Para pesquisa do gene EGFR, foram identificadas 20 células com núcleos distintos. Foram contados os sinais em vermelho que representavam o cromossomo 7 e os sinais em verde que representavam o gene EGFR. Aberrações cromossômicas foram investigadas e definidas de acordo com critérios já descritos por DOBASHI et al. (2007):

Dissomia = Quando os sinais tanto do gene quanto do cromossomo eram iguais a 2 em mais de 80% das células contadas.

Baixo nível de amplificação = Quando o sinal do gene variava de 3 a 10, e o sinal do cromossomo era igual a 2, em mais de 50% das células contadas.

Polissomia = Quando o sinal do EGFR variava de 3 a 10, e o do cromossomo era maior que 2, em mais de 50% das células contadas.

Alto nível de amplificação = Quando o sinal do gene era maior que 10, e o do cromossomo igual a 2, em mais de 50% das células contadas.

4.7.2 HER2

Para pesquisa do gene HER2, identificamos 20 células com núcleos distintos. Foram contados os sinais em vermelho que representam o gene HER2 e os sinais em verde que representam o cromossomo 17.

Alterações gênicas foram investigadas e definidas de acordo com as recomendações do fabricante (DAKO®). Para o cálculo, foi feita a somatória dos sinais em vermelho e dos sinais em verde e calculada a razão HER2/CEN-17. As amostras que tiveram razão igual a 2 não foram consideradas amplificadas, e as que tiveram razão igual ou maior que 2, foram consideradas amplificadas.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As informações coletadas dos prontuários médicos e os dados das expressões imunoistoquímicas e das hibridizações *in situ* foram armazenadas em um banco de dados informatizado (Excel®, versão 2003, Microsoft) e posteriormente analisados com o programa de computador MedCalc versão 11.4.3.0 (MedCalc Software bvbs, Bélgica). Para a caracterização da população do estudo, foi utilizada a estatística descritiva, empregando-se porcentagens, médias e medianas. Para a análise das

variáveis categóricas, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado ou teste exato de Fisher, dependendo dos valores esperados nas tabelas de contingência.

Os estudos de sobrevida global foram realizados com o método de Kaplan Méier. Para todas as análises estatísticas o nível de significância foi de 0,05.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Foram realizadas as revisões das lâminas de todas as amostras selecionadas para a determinação dos achados histopatológicos como presença de lobulação, matriz mixóide, pleomorfismo, necrose, mitoses, células fusiformes e células epiteliais. Os achados estão descritos na Tabela 5.

As características histopatológicas foram determinadas nos tumores primários e nas recidivas tumorais separadamente (Tabelas 5 e 6). O grupo dos tumores primários foi constituído por 26 (44,8%) amostras, sendo 2 (7,7%) cordomas do tipo condróide (Figura 4A) e 24 (92,3%) amostras do tipo convencional (Figura 4B). A lobulação foi detectada em 7 (27%) amostras e esteve ausente em 19 (73%). Esta característica encontra-se representada na Figura 4C. A presença de matriz mixóide foi vista em 18 (69,2%) amostras e estiveram ausentes em 8 (30,8%), células pleomórficas estiveram presentes em 15 (57,7%) amostras e ausentes em 11 amostras (42,3%). Células pleomórficas estão representadas na Figura 4D. Áreas de necrose foram observadas em 5 (19,2%) amostras (Figura 4E) e 4 (15,4%) cordomas exibiam células fusiformes (Figura 4F). Mitoses e células epitelióides estavam ausentes em todos os casos.

O grupo das recidivas foi representado por 32 (55,2%) cordomas. O subtipo histológico mais freqüente foi o convencional, observado em 24 (75%) amostras, sendo 8 (25%) amostras de cordomas condróides. Neste grupo, a lobulação esteve presente em 13 (40,6%) cordomas e ausente em 19 (59,4%). Matriz mixóide esteve presente em 27 (84,4%) amostras de cordomas e ausente em 5 (15,6%) amostras. Presença de pleomorfismo celular foi observada em 24 (75%) e ausente em 8 (25%). Áreas de necrose estavam presentes em 7 (21,9%) amostras e ausentes em 25 (78,1%). Células fusiformes estiveram ausentes na maioria das amostras, 31 (96,9%), e estiveram presentes em apenas uma (3,1%) amostra. Mitoses e células epitelióides também não foram observados neste grupo. Não observamos a presença de cordoma desdiferenciado tanto no grupo de tumores primários quanto no grupo das recidivas.

Tabela 5 - Características histopatológicas dos cordomas primários.

Variável	Categoria	N (caso)	Porcentagem (%)
Subtipo Histológico	Convencional	24	92,3
	Condróide	2	7,7
Lobulação	Presente	7	27
	Ausente	19	73
Matriz Mixóide	Presente	18	69,2
	Ausente	8	30,8
Pleomorfismo	Presente	15	57,7
	Ausente	11	42,3
Necrose	Presente	5	19,2
	Ausente	21	80,8
Mitose	Presente	0	0
	Ausente	26	100
Células Epitelióides	Presente	0	0
	Ausente	26	100
Células Fusiformes	Presente	4	15,4
	Ausente	22	84,6

Tabela 6 – Características histopatológicas dos cordomas recidivados.

Variável	Categoria	N (casos)	Porcentagem (%)
Subtipo Histológico	Convencional	24	75
	Condróide	8	25
Lobulação	Presente	13	40,6
	Ausente	19	59,4
Matriz Mixóide	Presente	27	84,4
	Ausente	5	15,6
Pleomorfismo	Presente	24	75
	Ausente	8	25
Necrose	Presente	7	21,9
	Ausente	25	78,1
Mitose	Presente	0	0
	Ausente	32	100
Células Epitelióides	Presente	0	0
	Ausente	32	100
Células Fusiformes	Presente	1	3,1
	Ausente	31	96,9

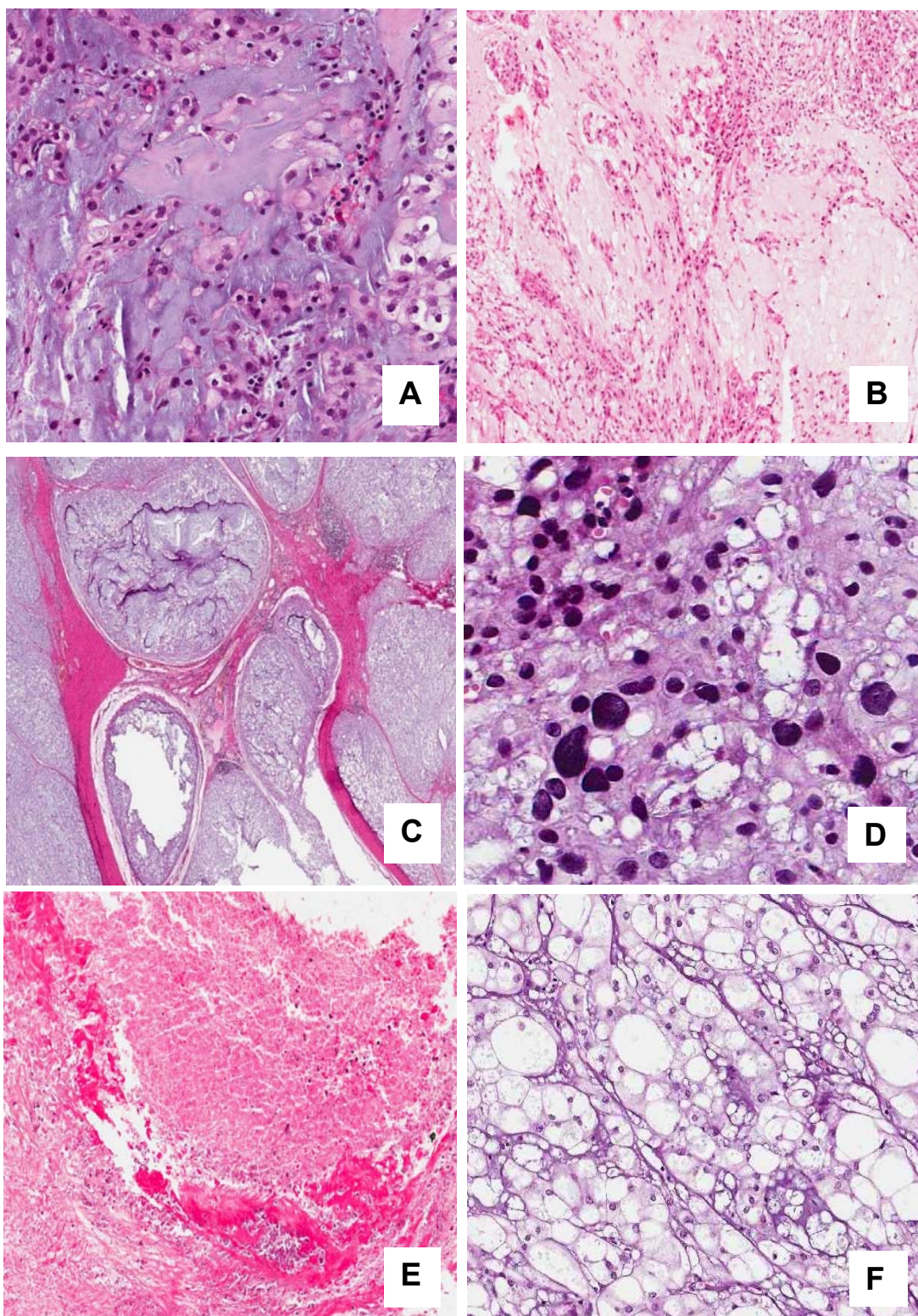


Figura 4 - Características histológicas das amostras de cordoma. A: Matriz mixóide densa de um cordoma condróide (Tamanho original 40x); B: Matriz mixóide de um cordoma convencional (Tamanho original 20x); C: Lobulação (Tamanho original 20x); D: Cordoma apresentando pleomorfismo nuclear (Tamanho original 40x); E: Necrose (Tamanho original 20x); F: Células fisalíferas (Tamanho original 40x).

5.2 CORRELAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DOS CORDOMAS PRIMÁRIOS E RECIDIVADOS.

O grupo dos tumores primários (n=26) foi constituído por 24 (92,3%) cordomas convencionais e 2 (7,7%) cordomas condróides.

Dentre os cordomas convencionais (n=24), 6 (25%) apresentaram crescimento de padrão lobular e 18 (75%) não apresentaram. A matriz mixóide foi observada em 16 (66,7%) amostras e esteve ausente em 8 (33,3%). Células pleomórficas estavam presentes em 14 (58,3%) e ausentes em 10 (41,7%). Áreas de necrose foram observadas em 4 (16,7%) e estiveram ausentes em 20 (83,3%). Áreas mais celulares apresentando células fusiformes foram vistas em 4 (16,7%) e não foram vistas em 20 amostras (83,3%).

Os cordomas condróides representados por 2 amostras exibiam lobulação e matriz mixóide (100%). Pleomorfismo e áreas com necrose foram observados em apenas um caso (50%). Células fusiformes não foram observadas neste subtipo histológico.

O grupo das recidivas (n=32) foi representado por 24 (75%) cordomas convencionais e 8 (25%) condróides.

Neste grupo, os cordomas convencionais (n=24) apresentaram 7 (29,2%) amostras com lobulação e 17 (70,8%) amostras sem essa característica. Matriz mixóide foi observada em 19 amostras (79,2%) e esteve ausente em 5 (20,8%). Presença de pleomorfismo foi observada em 18 (75%) amostras e esteve ausente em 6 (25%). Este subtipo histológico

apresentou 5 (20,8%) amostras com áreas de necrose e somente 1 (4,2%) amostra com células fusiformes.

Nos cordomas condróides (n=8), foram observadas 5 (62,5%) amostras com crescimento de padrão lobular e 3 (37,5%) sem lobulação. A presença de matriz mixóide foi detectada em todas as amostras (100%). Pleomorfismo foi observado em 6 (75%) e não foi observado em 2 (25%). Áreas de necrose foram vistas em 2 amostras (25%) e não foram vistas em 6 (75%). Nenhuma amostra apresentou células fusiformes.

Células epitelióides e mitoses estiveram ausentes tanto no grupo dos tumores primários, quanto no das recidivas. As associações entre as características histopatológicas e cordomas primários ou recidivados estão representadas na Tabela 7. Associações estatisticamente significativas não foram observadas.

Tabela 7 - Correlações entre as características histológicas e tumor primário e recidivado.

Variável	Categoria	Tumor primário (n=26)	Recidiva (n=32)	Valor de p
Subtipo Histológico	Convencional	24	24	0,16
	Condróide	2	8	
Lobulação	Presente	7	13	0,40
	Ausente	19	19	
Matriz Mixóide	Presente	18	27	0,21
	Ausente	8	5	
Pleomorfismo	Presente	15	24	0,26
	Ausente	11	8	
Necrose	Presente	5	7	1,00
	Ausente	21	25	
Células Fusiformes	Presente	4	1	0,16
	Ausente	22	31	

5.3 RESULTADOS DAS EXPRESSÕES IMUNOISTOQUÍMICAS

5.3.1 c-KIT

Do total das 58 amostras de cordomas selecionados, 53 amostras foram analisadas por imunoistoquímica para a expressão de c-KIT. Positividade citoplasmática para este marcador foi observada em 41 (77,4%) amostras. Sendo destas, 18 (34%) positivas fracas (escore 1+), 15 (28,3%) positivas moderadas (escore 2+) e 8 (15,1%) positivas fortes (escore 3+). Doze amostras (22,6%) foram negativas (escore 0) para este marcador. Marcações com positividade forte (escore 3+) e moderada (escore 2+) estão representadas nas Figuras 5A e B, respectivamente.

5.3.2 pAKT

Foram analisadas 54 amostras para este marcador. Destas, 27 (50%) amostras apresentaram positividade forte (escore 3+), 17 (31,5%) apresentaram marcação moderada (escore 2+) e 9 apresentaram (16,7%) marcação fraca (escore 1+). Apenas uma amostra (1,8%) foi negativa (escore 0). Marcações com positividade forte (escore 3+) e moderada (escore 2+) podem ser vistas nas Figuras 5C e D, respectivamente.

5.3.3 PDGFR- α

Para a pesquisa IHQ da expressão de PDGFR- α , foram analisadas 52 amostras. Todos os casos estudados (100%) expressaram positividade para este marcador, sendo 4 (7,7%) amostras com marcação fraca (escore 1+),

37 (71,1%) com marcação moderada (escore 2+) e 11 (21,2%) com marcação forte (escore 3+). Marcação com positividade forte (escore 3+) está representada na Figura 5E.

5.3.4 PDGFR- β

As reações imunoistoquímicas para este marcador foram realizadas com sucesso em 53 amostras. Positividade foi detectada em 51 (96,2%) amostras. A maioria delas apresentando positividade com marcação moderada (escore 2+), 33 (62,3%) amostras. Marcação fraca (escore 1+) foi observada em 6 (11,3%) amostras e 12 (22,6%) amostras apresentaram marcação forte (escore 3+). Apenas 2 (3,8%) amostras foram negativas (escore 0). Marcação com positividade forte (escore 3+) está representada na Figura 5E.

5.3.5 c-MET

Foram analisados dois padrões de marcação desta proteína: citoplasmática e de membrana. Para ambos os padrões, foram avaliadas 48 amostras.

Na análise da marcação citoplasmática, todas as amostras foram positivas. Observamos que a maioria delas apresentou positividade moderada (escore 2+), 29 (60,4%) amostras, seguida de 17 (35,4%) que apresentaram positividade forte (escore 3+). Apenas 2 (4,2%) amostras apresentaram positividade fraca (escore 1+).

Na análise de marcação de membrana, 45 amostras (93,7%) foram positivas. A maioria apresentou positividade moderada (escore 2+), 31 (64,6%) amostras, 10 (20,8%) foram positivas fortes (escore 3+) e 4 (8,4%), positivas fracas (escore 1+). Das 48 amostras analisadas, 3 (6,3%) foram negativas (escore 0). Marcações de membrana e citoplasma com positividade forte (escore 3+) estão apresentadas nas Figuras 6A e B.

5.3.6 c-erbB-2

Para este marcador, 54 amostras foram analisadas. Escore 1 foi observado em 31 (57,4%) amostras e 13 (24,1%) amostras apresentaram escore 2. Nenhuma amostra apresentou escore 3 para c-erbB-2. Nove (16,7%) amostras apresentaram escore 0. Marcações de membrana com escore 1 e 2 podem ser observadas nas Figuras 6C e D, respectivamente.

5.3.7 EGFR

O total de amostras analisadas para a imunoistoquímica deste marcador foi 51. Destas, 32 (62,65%) escore 1, 5 (9,8%) amostras apresentaram escore 2 e 8 (15,7%) apresentaram escore 3. Seis (11,85%) amostras apresentaram escore 0. Marcações de membrana com escore 2 e 3 podem ser observadas nas Figuras 6E e F, respectivamente.

A Tabela 8 apresenta os resultados de todos os marcadores pesquisados por imunoistoquímica nas 58 amostras de cordomas, e a Figura 5 mostra exemplos de casos positivos na IHQ.

Tabela 8 - Resultado dos marcadores estudados por imunoistoquímica

Marcadores		
Escore	Categoria	Total
c-KIT		
0	Negativo	12 (22,6%)
1+	Positivo fraco	18 (34,0%)
2+	Positivo moderado	15 (28,3%)
3+	Positivo forte	8 (15,1%)
Total		53 (100%)
pAKT		
0	Negativo	1 (1,8%)
1+	Positivo fraco	9 (16,7%)
2+	Positivo moderado	17 (31,5%)
3+	Positivo forte	27 (50%)
Total		54 (100%)
PDGFR-α		
0	Negativo	0 (0%)
1+	Positivo fraco	4 (7,7%)
2+	Positivo moderado	37 (71,1%)
3+	Positivo forte	11 (21,2%)
Total		52 (100%)
PDGFR-β		
0	Negativo	2 (3,8%)
1+	Positivo fraco	6 (11,3%)
2+	Positivo moderado	33 (62,3%)
3+	Positivo forte	12 (22,6%)
Total		53 (100%)
c-MET		
Citop.		
0	Negativo	0 (0%)
1+	Positivo fraco	2 (4,2%)
2+	Positivo moderado	29 (60,4%)
3+	Positivo forte	17 (35,4%)
Total		48 (100%)

Cont/Tabela 8

Marcadores	Categoria	Total
c-MET Memb.		
0	Negativo	3 (6,3%)
1+	Positivo fraco	4 (8,4%)
2+	Positivo moderado	31 (64,5%)
3+	Positivo forte	10 (20,8%)
Total		48 (100%)
c-erbB-2		
0	Negativo	10 (18,5%)
1+	Positivo fraco	31 (57,4%)
2+	Positivo moderado	13 (24,1%)
3+	Positivo forte	0 (0%)
Total		54 (100%)
EGFR		
0	Negativo	6 (11,85%)
1+	Positivo fraco	32 (62,65%)
2+	Positivo moderado	5 (9,8%)
3+	Positivo forte	8 (15,7%)
		51 (100%)

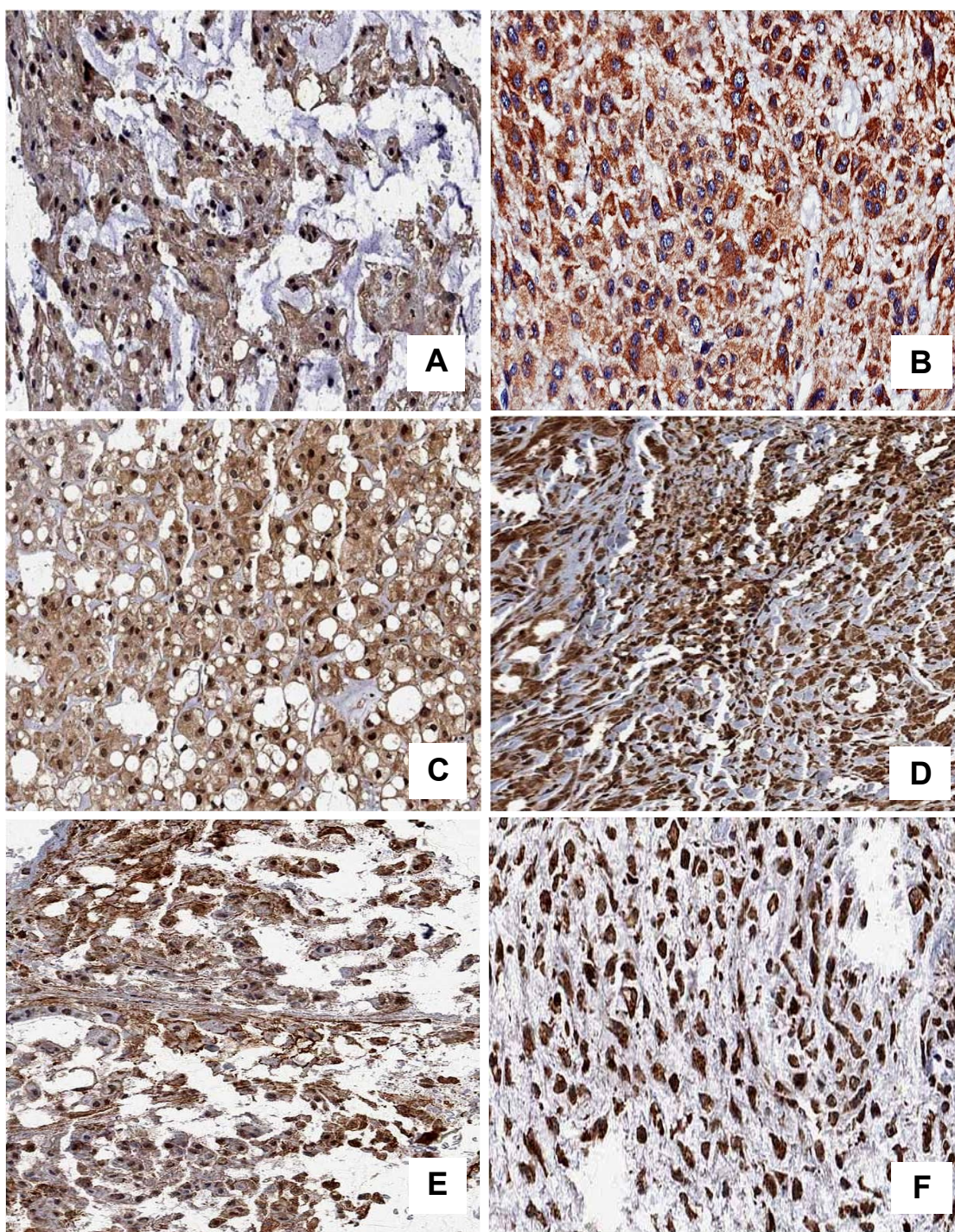


Figura 5 – Figuras representativas de imunoistoquímica para os marcadores c-KIT, pAKT e PDGFR α e β . A e B: c-KIT com marcação moderada (2+) e marcação forte (3+), respectivamente (tamanhos originais, 40x); C e D: pAKT com marcação moderada (2+) e forte (3+), respectivamente (tamanhos originais 20x e 40x); E: PDGFR-alfa com marcação forte (3+) (tamanho original 20x); F: PDGFR-beta com marcação forte (3+) (tamanho original 40x).

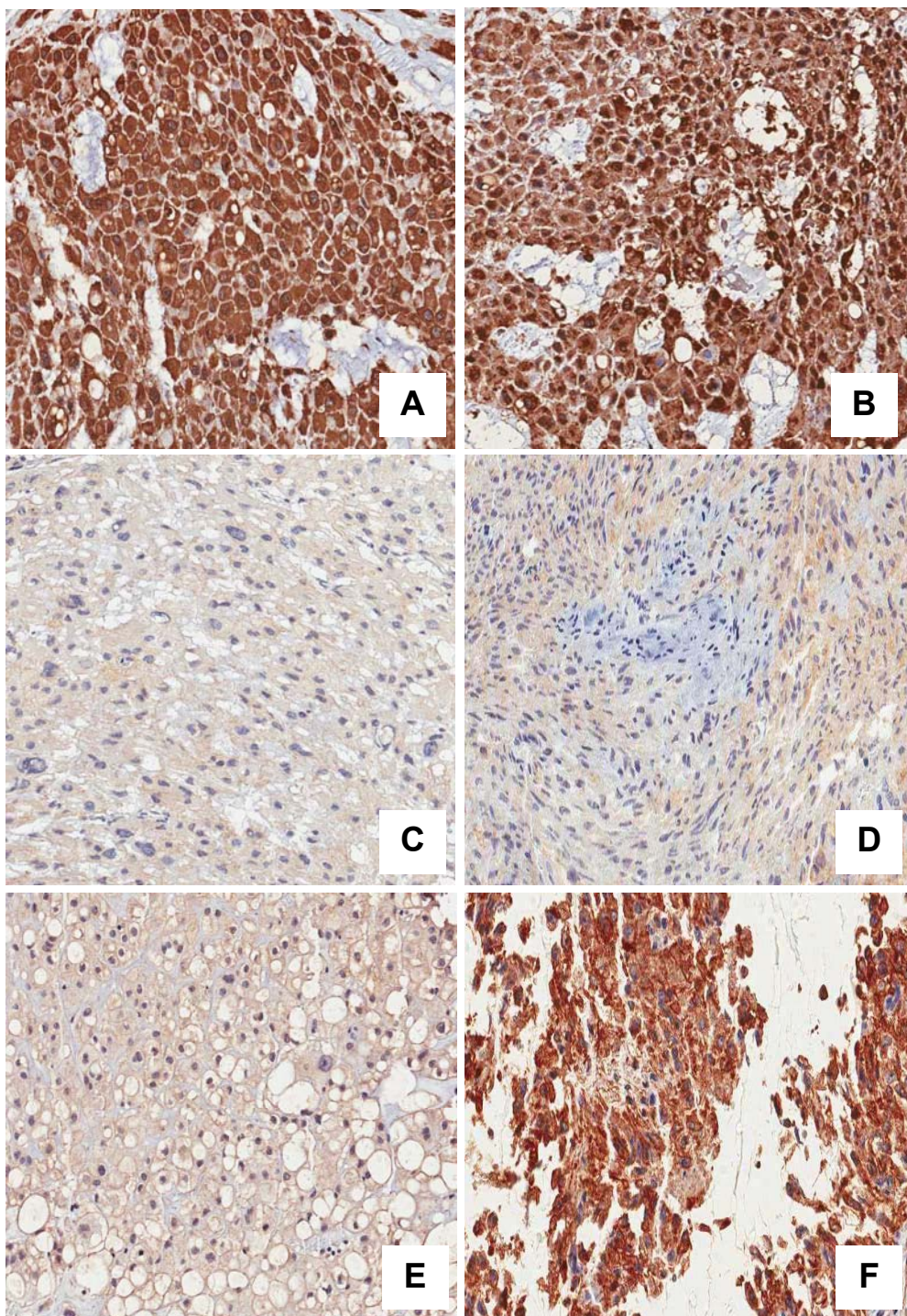


Figura 6 - Figuras representativas de imunoistoquímica para os marcadores c-MET, c-erbB-2 e EGFR. A e B: c-MET com marcação forte (escore3+) de membrana e citoplasma (tamanhos originais, 40x); C e D:c-erbB-2 com escore 1 e escore 2, respectivamente (tamanhos originais, 40x e 20x); E e F: EGFR com escore 2 e escore 3, respectivamente (tamanhos originais, 40x e 20x).

5.4 CORRELAÇÕES ENTRE OS MARCADORES E TUMORES PRIMÁRIOS E RECIDIVADOS

5.4.1 c-KIT

Das 53 amostras analisadas para este marcador, 23 (43,35%) eram tumores primários. Neste grupo, a maioria dos casos foram positivos para c-KIT: 7 (13,2%) escore 1+, 6 (11,3%) escore 2+ e 4 (7,55%) escore 3+. O grupo das recidivas foi representado por 30 (56,65%) amostras, sendo 24 positivas para c-KIT. Quando comparamos a expressão de c-KIT nos cordomas primários ou recidivados não encontramos diferenças estatisticamente significativas ($p=0,902$). Estes resultados estão representados na Tabela 9.

5.4.2 pAKT

Vinte e três amostras (42,6%) representaram o grupo dos tumores primários e 31 (57,4%) amostras corresponderam ao grupo das recidivas, do total das 54 amostras avaliadas.

No grupo dos tumores primários ($n=23$), a maioria dos casos foram positivos, sendo a marcação forte (escore 3+) observada em 17 (31,5%) amostras, 2 (3,7%) amostras tiveram marcação moderada (escore 2+) e 3 (5,6%) exibiram marcação fraca (escore 1+). Apenas 1 (1,8%) caso foi negativo neste grupo. No grupo das recidivas, todas as amostras apresentaram positividade para pAKT. Neste grupo, 15 (27,8%) amostras

tiveram marcação moderada (escore 2+), 10 (18,5%) tiveram marcação forte (escore 3+) e 6 (11,1%) tiveram marcação fraca (escore 1+).

A associação entre a expressão de pAKT e cordomas primários e recidivados foi significativa ($p=0,005$). A maioria das amostras dos pacientes com cordomas primários mostraram positividade com marcação forte (escore 3+), e a maioria das amostras dos pacientes com cordomas recidivados mostraram positividade com marcação moderada (escore 2+). A associação pode ser vista na Tabela 9.

5.4.3 PDGFR- α

Para este marcador, 52 amostras foram analisadas, sendo 23 (44,2%) de tumores primários. Neste grupo, todos os casos foram positivos: 4 (7,7%) com escore 1+, 12 (23%) com escore 2+, e 7 (13,5%) com escore 3+. O grupo das recidivas foi representado por 29 (55,8%) amostras, sendo todas positivas. A maioria apresentou marcação moderada (escore 2+), 25 (48,1%), e o restante, 4 (7,7%) amostras apresentaram marcação forte (escore 3+).

A associação entre a expressão de PDGFR- α e cordomas primários e recidivados foi significativa ($p=0,012$).

5.4.4 PDGFR- β

Do total de amostras analisadas ($n=53$) na IHQ para este marcador, 23 (43,4%) corresponderam ao grupo dos tumores primários e 30 (56,6%) ao grupo das recidivas.

Nos cordomas primários, 14 (26,4%), apresentaram marcação moderada (escore 2+), 6 (11,3%) apresentaram marcação forte (escore 3+) e 1 (1,9%) apresentou marcação fraca (escore 1+). Apenas 2 (3,8%) amostras foram negativas para este marcador (escore 0).

No grupo das recidivas, todas as amostras foram positivas para PDGFR- β , 19 (35,9%) amostras com positividade moderada (escore 2+), 6 (11,3%) amostras com marcação forte (escore 3+) e 5 (9,4%) com marcação fraca (escore 1+). A grande maioria das amostras, tanto do grupo de cordomas primários como no grupo dos recidivados, foram positivas para PDGFR- β , entretanto, a correlação entre a expressão deste marcador e cordomas primários e recidivados não foi estatisticamente significativa ($p=0,205$) (Tabela 9).

5.4.5 c-MET

Na análise da expressão citoplasmática ($n=48$), observamos 21 (43,8%) amostras representando o grupo dos tumores primários e 27 (56,2%) amostras, o grupo das recidivas. No grupo dos tumores primários todas as amostras foram positivas para c-MET, sendo a marcação moderada (escore 2+) observada em 13 (27,1%) amostras e 8 (16,7%) amostras com marcação forte (escore 3+). As amostras do grupo de recidivas foram todas positivas para c-MET, 16 (33,3%) apresentaram marcação moderada (escore 2+), 9 (18,7%) apresentaram marcação forte (escore 3+) e apenas 2 (4,2%) amostras apresentaram marcação fraca (escore 1+).

Para marcação de membrana (n=48), 21 (43,8%) amostras representaram o grupo dos tumores primários e 27 (56,2%) o grupo das recidivas. No grupo dos tumores primários (n=21), apenas 1 (2,1%) amostra foi negativa (escore 0). Quatorze (29,1%) amostras tiveram marcação moderada (escore 2+), 3 (6,3%) tiveram marcação forte (escore 3+) e 3 (6,3%) tiveram marcação fraca (escore 1+). No grupo das recidivas (n=27), apenas 2 (4,2%) amostras foram negativas (escore 0). A marcação moderada (escore 2+) foi observada em 17 (35,4%) amostras, 7 (14,5%) amostras exibiram marcação forte (escore 3+) e 1 (2,1%) mostrou marcação fraca (escore 1+).

As associações entre expressões de c-MET em ambos os padrões (citoplasmático e de membrana) e cordomas primários e recidivados foram pesquisadas e não foram encontradas correlações significativas entre as variáveis (p= 0,439 e p= 0,473).

5.4.6 c-erbB-2

Do total das 54 amostras avaliadas para este marcador, o grupo dos tumores primários foi representado por 24 (44,4%) amostras e o grupo das recidivas por 30 (55,6%).

No grupo dos tumores primários, o escore 1 foi observado em 14 (25,9%) amostras, 6 (11,1%) apresentaram escore 2 e nenhuma (0%) amostra exibiu escore 3. Do total de amostras do grupo, apenas 4 (7,4%) apresentaram escore 0. No grupo das recidivas, 6 (11,1%) amostras apresentaram escore 0. O restante apresentou positividade para c-erbB-2,

onde 17 (31,5%) amostras apresentaram escore 1, 7 (13%) apresentaram escore 2+, e nenhuma (0%) apresentou escore 3.

Não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão de c-erbB-2 e cordomas primários ou recidivados ($p = 0,908$).

5.4.7 EGFR

Do total de amostras analisadas para EGFR ($n=51$), 22 (43,2%) corresponderam ao grupo dos cordomas primários, e 29 (56,8%) ao grupo dos recidivados.

No grupo dos tumores primários ($n=22$), 4 (7,85%) amostras foram escore 0, 12 (23,5%) apresentaram escore 1, 2 (4%) apresentaram escore 2 e 4 (7,85%) exibiram escore 3. No grupo das recidivas ($n=29$), apenas 2 (4%) amostras foram escore 0. A maioria das amostras, 20 (39,15%) exibiram escore 1, 3 (5,8%) apresentaram escore 2 e 4 (7,85%), escore 3.

A correlação entre a expressão deste marcador e cordomas primários e recidivados foi analisada e não foi encontrada correlação estatisticamente significativa ($p= 0,584$).

Tabela 9 - Correlações entre as expressões dos marcadores na IHQ e tumores primários e recidivados.

Marcadores	Tumores Primários	Recidivas	Total	Valores de p
c-KIT				
0	6 (11,3%)	6 (11,3%)	12 (22,6%)	0,902
1+	7 (13,2%)	11 (20,8%)	18 (34,0%)	
2+	6 (11,3%)	9 (17%)	15 (28,3%)	
3+	4 (7,55%)	4 (7,55%)	8 (15,1%)	
Total	23 (43,35%)	30 (56,65%)	53 (100%)	
pAKT				
0	1 (1,8%)	0	1 (1,8%)	0,005
1+	3 (5,6%)	6 (11,1%)	9 (16,7%)	
2+	2 (3,7%)	15 (27,8%)	17 (31,5%)	
3+	17 (31,5%)	10 (18,5%)	27 (50%)	
Total	23 (42,6%)	31 (57,4%)	54 (100%)	
PDGFR-α				
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,012
1+	4 (7,7%)	0 (0%)	4 (7,7%)	
2+	12 (23%)	25 (48,1%)	37 (71,1%)	
3+	7 (13,5%)	4 (7,7%)	11 (21,2%)	
Total	23 (44,2%)	29 (55,8%)	52 (100%)	
PDGFR-β				
0	2 (3,8%)	0	2 (3,8%)	0,205
1+	1 (1,9%)	5 (9,4%)	6 (11,3%)	
2+	14 (26,4%)	19 (35,9%)	33 (62,3%)	
3+	6 (11,3%)	6 (11,3%)	12 (22,6%)	
Total	23 (43,4%)	30 (56,6%)	53 (100%)	
c-MET Citop.				
0	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0,439
1+	0 (0%)	2 (4,2%)	2 (4,2%)	
2+	13 (27,1%)	16 (33,3%)	29 (60,4%)	
3+	8 (16,7%)	9 (18,7%)	17 (35,4%)	
	21 (43,8%)	27 (56,2%)	48 (100%)	
c-MET Memb.				
0	1 (2,1%)	2 (4,2%)	3 (6,3%)	0,473
1+	3 (6,3%)	1 (2,1%)	4 (8,4%)	
2+	14 (29,1%)	17 (35,4%)	31 (64,5%)	
3+	3 (6,3%)	7 (14,5%)	10 (20,8%)	
Total	21 (43,8%)	27 (56,2%)	48 (100%)	

Cont/ Tabela 9

Marcadores	Tumores Primários	Recidivas	Total	Valores de p
c-erbB-2				
0	4 (7,4%)	6 (11,1%)	10 (18,5%)	0,908
1+	14 (25,9%)	17 (31,5%)	31 (57,4%)	
2+	6 (11,1%)	7 (13%)	13 (24,1%)	
3+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Total	24 (44,4%)	30 (55,6%)	54 (100%)	
EGFR				
0	4 (7,85%)	2 (4%)	6 (11,85%)	0,584
1+	12 (23,5%)	20 (39,15%)	32 (62,65%)	
2+	2 (4%)	3 (5,8%)	5 (9,8%)	
3+	4 (7,85%)	4 (7,85%)	8 (15,7%)	
Total	22 (43,2%)	29 (56,8%)	51 (100%)	

5.5 FISH

Amostras de cordomas com escore 2 e 3 nas reações de imunoistoquímica para os marcadores EGFR e HER2 foram selecionadas para a realização do FISH. Para análise de EGFR, foram selecionadas 13 amostras com escore 2 e 3 que dispunham de material suficiente para realização do FISH. Das 13 amostras, 6 (46,2%) eram de tumores primários e 7 (53,8%) de recidivas. Para pesquisa do gene HER2, foram selecionadas 11 amostras com escore 2 que dispunham de material em bloco de parafina suficiente para as análises. Das 11 amostras, 5 (45,4%) eram amostras de tumores primários e 6 (54,5%) recidivas.

5.5.1 EGFR

A pesquisa do estatus do gene EGFR foi realizada em 13 amostras, sendo 8 com escore 3 e 5 com escore 2 na imunoistoquímica. Das amostras selecionadas para análise, 7 (53,8%) foram realizadas com sucesso, sendo 3 com escore 3 e 4 com escore 2. As 6 (46,2%) amostras restantes foram descartadas pela ausência de sinais do gene ou do cromossomo.

Entre as amostras que apresentaram marcações gênicas e cromossômicas, 4 (57,2%) eram amostras de tumores primários, e 3 (42,8%) de recidivas.

Os critérios adotados para a investigação de aberrações cromossômicas e gênicas foram os critérios já descritos por Dobashi et al. (2007), e de acordo com estes critérios, 5 (71,4%) amostras foram classificadas como dissomia, ou seja, o número de cópias tanto do gene quanto do cromossomo foi igual a 2 em mais de 80% das células contadas. As 2 (28,6%) amostras restantes apresentaram polissomia, isto é, o número de cromossomos foi maior do que 2, e o número de genes variou de 3 a 10 em mais de 50% das células contadas. Das amostras que foram classificadas como dissomia, 3 eram escore 3 e 2 eram escore 2, e as 2 amostras que foram classificadas como polissomia eram escore 2. Baixo nível de amplificação foi observado em alguns núcleos, porém, de acordo com o critério utilizado, o número de células apresentando estas características em cada amostra analisada, não foi suficiente para classificar estas amostras como alteradas. A Figura 7 mostra casos representativos de polissomia e dissomia do gene EGFR através do FISH.

5.5.2 HER2

A pesquisa do estatus do gene HER2 foi realizada em 11 amostras, sendo todas as amostras com escore 2 na imunoistoquímica. As outras 2 amostras que apresentaram escore 2 na IHQ foram excluídas pois não dispunham de material suficiente para as análises. Das 11 amostras selecionadas para análise, 6 (54,5%) foram realizadas com sucesso. As 5 (45,5%) amostras restantes foram descartadas por não apresentarem sinais do gene ou do cromossomo.

O critério adotado para a investigação de amplificações gênicas foi o recomendado pelo fabricante (DAKO®). De acordo com este critério, não foram observadas amplificações de HER2 em nenhuma das 6 amostras, e a razão HER2/CEP17 variou entre 1,2 e 1,78 (Tabela 10). Das 6 amostras que apresentaram marcação do cromossomo e do gene, 3 (50%) eram amostras de cordomas recidivados e 3 (50%) de tumores primários. A Figura 8 mostra um núcleo com dissomia para HER2.

Tabela 10 - Resultados de FISH para a pesquisa do estatus do gene HER2

Caso	Razão HER2/CEP17	Estatus
1	1,78	Não amplificado
2	1,16	Não amplificado
3	1,77	Não amplificado
4	1,29	Não amplificado
5	1,28	Não amplificado
6	1,20	Não amplificado

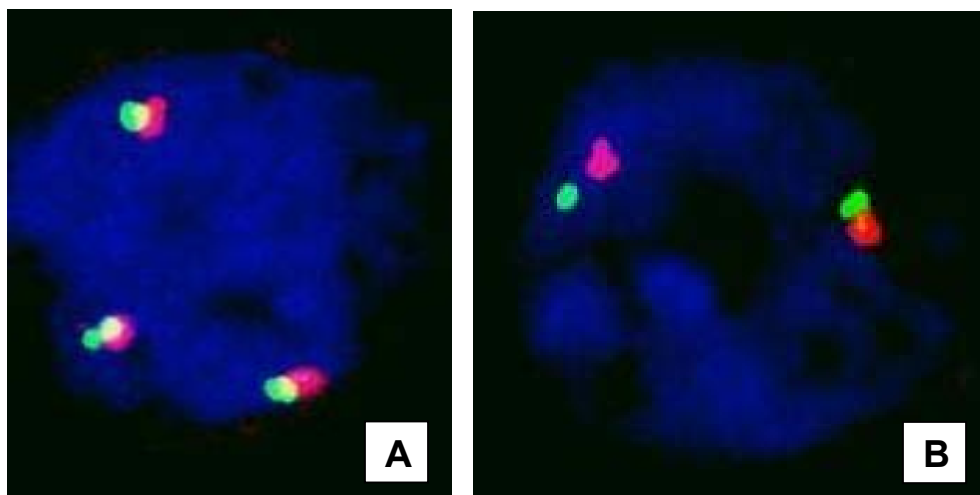


Figura 7 - FISH para a pesquisa do estatus do gene EGFR. A: Polissomia, célula apresentando 3 sinais do gene (verde) e 3 sinais do cromossomo (vermelho). B: Dissomia, célula apresentando 2 sinais de gene e 2 de cromossomo

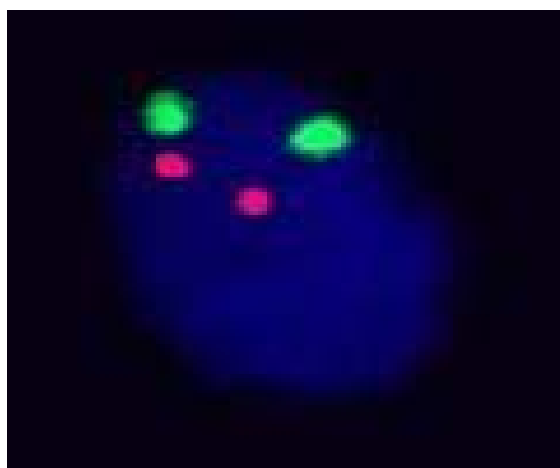


Figura 8 - FISH para a pesquisa do estatus do gene HER2. Célula apresentando 2 sinais do gene e 2 do cromossomo.

ANÁLISES DE SOBREVIDA

6 ANÁLISES DE SOBREVIDA

6.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS

6.1.1 Análise Univariada

A média de sobrevida global dos pacientes foi de 95 meses. A Figura 9 mostra a curva de sobrevida global dos 38 pacientes com cordomas.

As análises univariadas da sobrevida global em 5 anos (60 meses) dos 38 pacientes com cordomas foram calculadas de acordo com as curvas de sobrevida de Kaplan Méier. Neste período, 29 (50%) pacientes estavam vivos e 9 (50%) mortos. Dentre os pacientes vivos, 15 pacientes estavam vivos sem doença e 14 vivos com a doença. Dentre os óbitos, 27 morreram especificamente por cordoma e 2 morreram por outras causas.

Nenhuma das variáveis histopatológicas estudadas apresentou associações estatisticamente significativas em relação às taxas de sobrevida global em 5 anos (Tabela 11). Pacientes do sexo masculino mostraram uma taxa de sobrevida em 5 anos (72,2%) discretamente melhor em relação aos pacientes do sexo feminino (62,4%). Entretanto, esta diferença não foi significativa ($p=0,45$). Pacientes com cordomas com ausência de matriz mixóide mostraram taxa de sobrevida de 75% em 5 anos, e aqueles com cordomas com matriz mixóide apresentaram a taxa de sobrevida de 61,4%. Esta diferença também não foi estatisticamente significativa ($p=0,75$). A

presença de lobulação não mostrou diferença estatisticamente significativa na sobrevida global dos pacientes ($p=0,85$).

Pacientes com cordomas apresentando pleomorfismo celular tiveram uma taxa de sobrevida de 66,4%, enquanto os pacientes que não apresentaram pleomorfismo tiveram uma taxa de 61,1%. Este resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,82$). Resultado semelhante foi observado em relação à presença de necrose. Pacientes que apresentaram áreas de necrose em suas amostras tiveram taxa de sobrevida de 62,5%, e aqueles que não apresentaram tiveram uma taxa de 66,1%. A diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,84$). Metade dos pacientes que tinham cordomas exibindo células fusiformes estavam vivos em 5 anos, sendo a taxa de 65,6% para aqueles com cordomas sem células fusiformes. Pacientes com cordomas condróides mostraram taxa de sobrevida de 71,4%, sendo esta taxa de 63,1% para os pacientes com cordomas convencionais. Associações entre estas duas últimas características não foram estatisticamente significativas ($p=0,60$ e $p=0,76$, respectivamente).

Tabela 11 - Análise univariada dos parâmetros clínicos e histopatológicos em relação à sobrevida global em 5 anos dos pacientes com cordomas.

Variáveis	Categorias	Número de casos	Sobrevida global em 5 anos (%)	Valor de p
Gênero	Masculino	19	72,2	0,45*
	Feminino	19	62,4	
Matriz mixóide	Presença	29	61,4	0,75
	Ausência	9	75	
Lobulação	Presença	13	65,8	0,85*
	Ausência	25	64	
Pleomorfismo	Presença	27	66,4	0,82*
	Ausência	11	61,1	
Necrose	Presença	8	62,5	0,84*
	Ausência	30	66,1	
Células Fusiformes	Presença	34	50	0,60*
	Ausência	4	65,6	
Subtipo Histológico	Convencional	31	63,1	0,76*
	Condróide	7	71,4	

*Comparação de curvas de sobrevida feita pelo Teste de Log-rank.

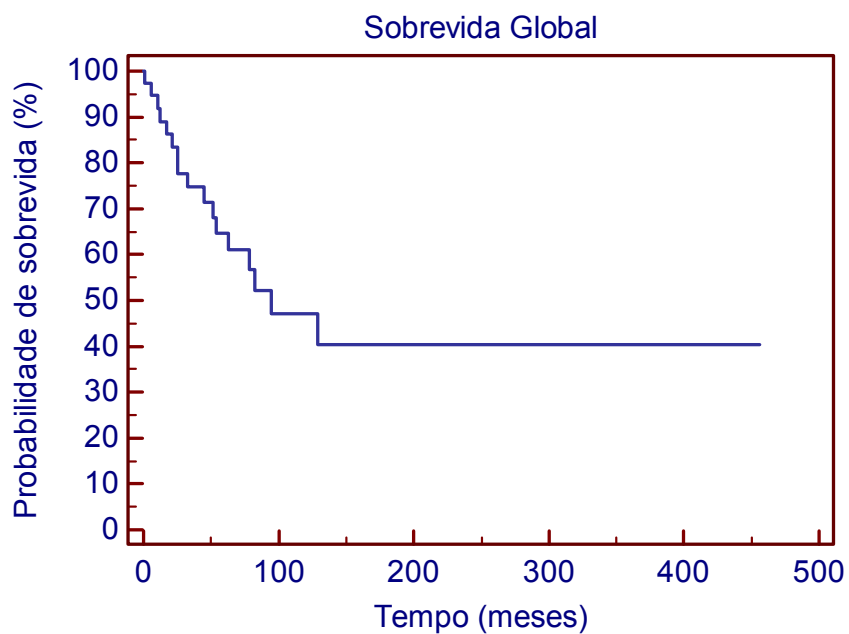


Figura 9 - Gráfico representativo da sobrevida global dos pacientes.

6.2 ANÁLISES DOS MARCADORES

6.2.1 Análise Univariada

As análises univariadas de sobrevida global em 5 anos dos pacientes com cordomas em relação aos resultados das expressões imunoistoquímicas, mostraram associação somente entre a expressão de pAKT e a taxa de sobrevida dos pacientes. A expressão desta proteína parece estar diretamente associada a piores taxas de sobrevida em 5 anos. Pacientes que foram negativos e os que tiveram marcação fraca (escore 1+) para a proteína pAKT, mostraram taxa de sobrevida em cinco anos de 100%. Essa taxa cai para 78% para os pacientes com marcação moderada (escore 2+) e para 45% para os pacientes com marcação forte (escore 3+). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p= 0,042$). A Figura 10 mostra as curvas de sobrevida deste marcador. A Tabela 12 apresenta as taxas de sobrevida global em 5 anos dos pacientes em relação às expressões das demais proteínas estudadas por imunoistoquímica.

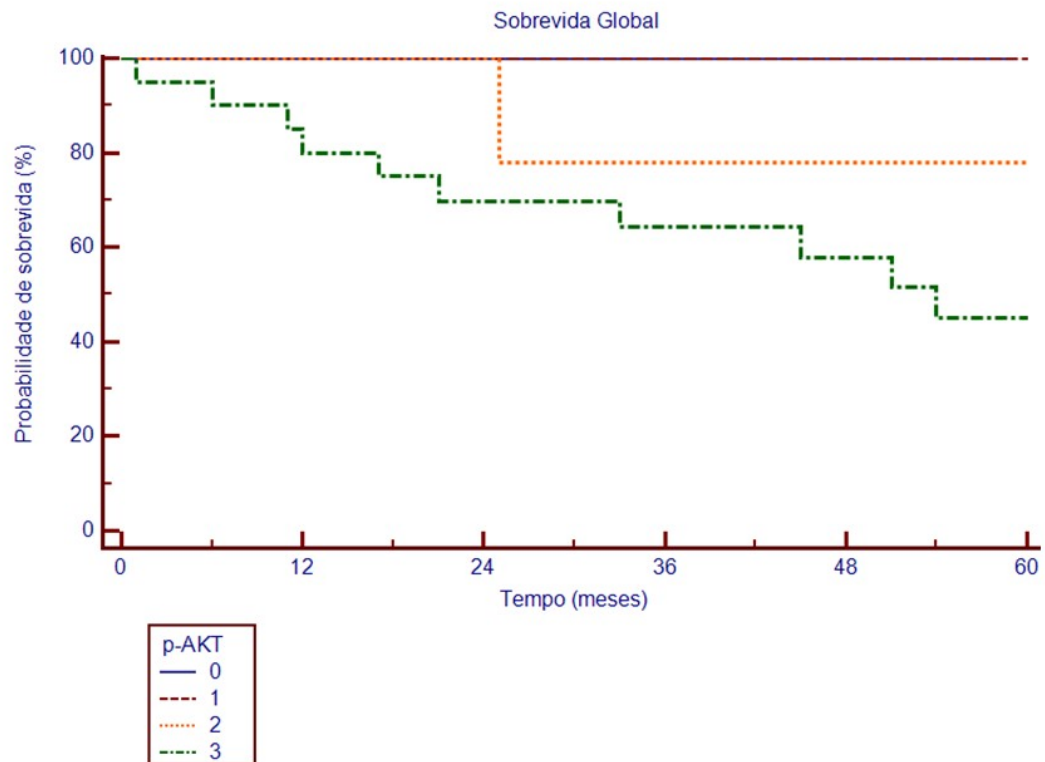


Figura 10 - Curvas de sobrevivência global dos pacientes com cordoma em relação à expressão imunoistoquímica de AKT fosforilada.

Tabela 12 - Taxas de sobrevida global em 5 anos dos pacientes em relação às expressões das proteínas estudadas por imunistoquímica.

Marcadores	Número de casos	Sobrevida global em 5 anos (%)	Valores de p
c-KIT			
0	10 (27,7%)	66,7	0,882*
1+	9 (25%)	33,3	
2+	12(33,3%)	74,1	
3+	5 (13,8%)	75	
Total	36		
PDGFR-α			
1+	4(11,43%)	100	0,304*
2+	22 (62,86%)	58,9	
3+	9 (25,71%)	66,7	
Total	35		
PDGFR-β			
0	2 (5,56%)	100	0,424*
1+	3 (8,34%)	66,7	
2+	23 (63,88%)	63	
3+	8 (22,22%)	46,9	
Total	36		
c-erbB-2			
0	6 (16,66%)	66,7	0,877*
1+	22 (61,12%)	59,7	
2+	7 (19,44%)	66,7	
3+	1 (2,78%)	100	
Total	36		
AKT- phospho			
0	1 (2,70%)	100	0,042*
1+	5 (13,52%)	100	
2+	11 (29,73%)	78	
3+	20 (54,05%)	45	
Total	37		
c-MET Citop.			
1+	2 (6,07%)	100	0,632*
2+	21 (63,63 %)	57,1	
3+	10 (30,30%)	66,7	
	33		

Cont/ Tabela 12

Marcadores	Total	Sobrevida global em 5 anos (%)	Valores de p
c-MET Memb.			
0	1 (3,03%)	100	0,419*
1+	4 (12,12%)	50	
2+	23 (69,70 %)	61,5	
3+	5 (15,15%)	60	
Total	33		
EGFR			
0	5 (15,16%)	60	0,280*
1+	18 (54,54%)	72,8	
2+	4 (12,12%)	50	
3+	6 (18,18%)	55,6	
Total	33		

*Comparação de curvas de sobrevida feita pelo Teste de Log-rank.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Cordomas são neoplasias raras, de crescimento lento, de aparência gelatinosa, com características histológicas e fenotípicas de origem em restos da notocorda. Ocorrem em qualquer parte do corpo com diferentes apresentações clínicas, sendo mais freqüentes nas regiões sacrococcígea, clivus e cervical. É um tumor eminentemente de adultos e velhos, sendo raro em pacientes menores de 20 anos, mas também pode ocorrer em crianças e recém nascidos (MIRRA et al. 2002; CASALI et al. 2007; CHUGH et al. 2007; HORBINSKI et al. 2010; WALTER et al. 2011). No nosso estudo, também foi comum a presença de cordomas acometendo a região sacrococcígea, seguida da região do clivus e menos freqüentemente a região cervical. A idade de nossa amostra variou entre 10 meses e 86 anos, com média de 45 anos e mediana de 46 anos.

Histologicamente, os cordomas são classificados nos subtipos convencional, condróide e desdiferenciado. O tipo convencional é o mais comum, apresenta padrão de crescimento lobular, e é composto por células epitelióides, redondas ou poliédricas, isoladas ou em cordões, com citoplasma vacuolado (fisalífero) em matriz mucóide, com raras mitoses. Os cordomas condróides são mais freqüentes na junção craniocervical e são caracterizados por áreas de cordomas convencionais em meio a áreas cartilaginosas. O cordoma desdiferenciado é o tipo histológico menos freqüente e apresenta aspectos histológicos semelhantes aos

condrossarcomas (MIRRA et al. 2002; UNNI et al. 2005; TAMBORINI et al. 2006; CHUGH et al. 2007; FERRARESI et al. 2010). No nosso estudo, a maioria dos casos era constituída pelo subtipo convencional, seguido pelo tipo condróide. Nenhum caso do subtipo desdiferenciado foi encontrado. Existem relatos na literatura que associa o subtipo condróide ao pior prognóstico. No nosso estudo não encontramos esta associação, talvez devido ao pequeno número de casos da nossa casuística.

Em relação aos outros achados histopatológicos, há trabalhos na literatura que demonstram a associação entre a presença de necrose, pleomorfismo celular, atividade mitótica e matriz condróide com maiores taxas de recidiva tumoral e pior prognóstico (HEFFELFINGER et al. 1973; UNNI et al. 2005; LONGONI et al. 2008; FERRARESI et al. 2010; UNNI e INWARDS 2010). No presente estudo, estas características foram analisadas em todos os casos. Demonstramos que estas características estavam frequentemente presentes tanto nos tumores primários como nas recidivas tumorais, não sendo encontradas correlações estatísticas significantes. Portanto, no nosso estudo, os achados histológicos que conferem comportamento agressivo na maioria das neoplasias, não são importantes nos cordomas e não devem ser associados a comportamento mais agressivo.

Os cordomas apresentam sintomas de início insidioso, aparecendo somente em estágios avançados da doença. O tratamento de escolha é o cirúrgico, no entanto, a taxa de recorrência é bastante alta em torno de 70%. Embora pouco eficaz, a radioterapia tem sido indicada nestes casos. A

quimioterapia tem sido utilizada somente nos cordomas avançados para alívio dos sintomas ou nos cordomas desdiferenciados (FLEMING et al. 1993; BARATTI et al. 2003; CASALI et al. 2004, 2007; BRANDAL et al. 2005, McPHERSON et al. 2006; CHUGH et al. 2007; FERRARESI et al. 2010; HORBINSKI et al. 2010; WALTER et al. 2011). Na nossa casuística, cerca de 90% dos casos de cordoma foram submetidos à cirurgia, menos da metade dos casos foram submetidos à radioterapia e apenas alguns casos avançados foram submetidos à quimioterapia. Tratamento multimodal foi utilizado em alguns casos, sendo na maioria deles a combinação de cirurgia e radioterapia. A combinação de quimioterapia e radioterapia foi realizada em apenas um caso.

Apesar de ser raro, esta neoplasia pode dar origem a metástases, acometendo principalmente os pulmões, osso, fígado, tecidos moles, linfonodos e pele (BURGER e SCHEITHAUER 1994; MIRRA et al. 2002; FERRARESI et al. 2010).

O cordoma apresenta uma sobrevida global bastante baixa, de 6 anos, com uma média de 70% em 5 anos e 40% para 10 anos. O prognóstico é dependente principalmente da localização e tamanho da neoplasia (MIRRA et al. 2002; BARATTI et al. 2003; CASALI et al. 2004; BRANDAL et al. 2005; UNNI et al. 2005; BHADRA e CASEY 2006; BISCEGLIA et al. 2007; CHUGH et al. 2007; FERRARESI et al. 2010; UNNI e INWARDS 2010). Neste estudo, a média de sobrevida global dos pacientes foi de 95 meses e não foram associadas à localização tumoral.

Embora dados a respeito da biologia molecular associada aos cordomas tenha aumentado no último ano, os resultados ainda são controversos e os estudos conduzidos com uma casuística muito pequena. Sabe-se que os receptores de tirosina quinase estão frequentemente expressos, e por vezes, mutados. Alguns estudos demonstraram a eficiência do tratamento com inibidores desses receptores em alguns casos (CASALI et al 2004; BURGER et al. 2005; TAMBORINI et al. 2006; LONGONI et al. 2008; SINGHAL et al. 2009; FERRARESI et al. 2010; HORBINSKI et al. 2010; WALTER et al. 2011). Entretanto, pouco se sabe a respeito da biologia molecular associada a esses tumores. No presente estudo, foram analisadas as expressões imunoistoquímicas das proteínas: PDGFR alfa, PDGFR beta, c-KIT, EGFR, HER2, c-MET e AKT fosforilada. As expressões dos marcadores na imunoistoquímica foram correlacionadas com todas as variáveis clínicas e histopatológicas pesquisadas neste estudo. De maneira geral, observamos que os cordomas frequentemente expressam estas proteínas. Estes achados apontam estas proteínas como possíveis alvos terapêuticos para o tratamento dos cordomas, sobretudo nos cordomas primários, onde observamos que a forte expressão (escore 3+) de pAKT e PDGFR alfa foi mais freqüente do que nas recidivas. Embora a expressão moderada de PDGFR alfa tenha sido mais freqüente nos cordomas recidivados.

De fato, as oncoproteínas PDGFR alfa, PDGFR beta e c-KIT já foram encontradas frequentemente expressas nos cordomas, e a utilização do Imatinib® como inibidor destas oncoproteínas tem-se mostrado eficaz no

tratamento alternativos de alguns cordomas com melhoras clínicas, radiológicas e na qualidade de vida (CASALI et al. 2004; TAMBORINI et al. 2006; LONGONI et al. 2008; SINGHAL et al. 2009; FERRARESI et al. 2010). Embora BURGER et al. (2005) afirme que mesmo os cordomas apresentando c-KIT e PDGFR expressos, o uso de Imatinib[®] pode ser ineficiente e está aparentemente associado à presença ou não de mutações dessas oncoproteínas.

Os membros da família Erb: EGFR e HER2 também são encontrados expressos e ativados em cordomas. Os inibidores destas oncoproteínas, Gefitinib e Erlotinib, e alguns anticorpos monoclonais como Cetuximab e Panitumumab, já estão sendo utilizados nos tratamentos de diversos tumores sólidos (WEINBERGER et al. 2005; DOBASHI et al. 2007). Além disso, WALTER et al. (2011), relata que pacientes com cordomas que expressam EGFR, podem responder bem à terapia alvo molecular, inibindo a ativação das tirosinas quinases. O tratamento de cordomas combinando Gefitinib e Erlotinib tem sido reportado por alguns autores, apresentando uma boa resposta dos pacientes (HOF et al. 2006; LINDÉN et al. 2008; SINGHAL et al. 2009). Neste estudo, a maioria das amostras de cordomas analisadas tanto para EGFR, quanto para HER2 apresentaram positividade por imunoistoquímica, embora mais da metade das amostras de EGFR e HER2 tenham apresentado positividade fraca.

Em carcinoma de não pequenas células do pulmão, a análise de mutação de EGFR é um excelente preditor na resposta ao tratamento com inibidores de tirosina quinase (DANIELE et al. 2007). No nosso estudo, não

foram encontradas alterações gênicas por FISH, somente a presença de polissomia foi identificada em 2 casos. Durante a realização da reação de FISH, algumas amostras foram descartadas por não apresentarem sinais do gene ou do cromossomo. Isso pode ser decorrente principalmente pela degradação do DNA associada a algumas situações como as que se seguem: 1. material representado por tecido ósseo que foi submetido a algum tipo de tratamento prévio com ácido com o intuito de descalcificação; 2. Material antigo e fixado com formalina não tamponada; 3. Material antigo e embocado em parafina de má qualidade.

A oncoproteína c-MET possui alta afinidade com o fator de crescimento hepático (HGF/SF) e a alteração de sinalização de HGF/c-MET em cordomas representa um papel importante no potencial maligno desta neoplasia, especialmente em recorrências e pior prognóstico. Esta é uma característica importante para muitos tecidos, incluindo o câncer, e tem sido apontada como importante alvo das terapias genéticas (FORSYTH et al. 1993; FURUKAWA et al. 1995; RUCO et al. 1996, TERADA et al. 1998; HUG e SLATER 2000; AISHIMA et al. 2002; OSTROUMOV e HUNTER 2008; NAKA et al. 2009). Entretanto, para que o tratamento seja efetivo, este deve atuar contra atividade de c-MET e bloquear a sinalização do HGF, simultaneamente, promovendo a morte das células tumorais, além de oferecer um melhor prognóstico para pacientes com tumores irresssecáveis (MAZZONE e COMOGLIO 2006; OSTROUMOV e HUNTER 2008). Neste estudo, a maioria das amostras de cordomas pesquisadas para o marcador, tanto de marcação de membrana, quanto citoplasmática, apresentou positividade de marcação moderada na imunoistoquímica. Além disso, foi

observada uma maior expressão de c-MET em cordomas recidivados. Entretanto, não foi encontrada associação prognóstica para estes pacientes.

Em relação à análise global de sobrevida em 5 anos, não foi encontrada diferença significativa entre as variáveis clínicas e histológicas durante a análise univariada dos pacientes com cordomas. Nas análises univariadas de sobrevida global em 5 anos em relação aos resultados de imunohistoquímica das proteínas estudadas, foi encontrada associação somente entre a expressão imunohistoquímica de pAKT e a taxa de sobrevida dos pacientes. A expressão de pAKT aparentemente está diretamente associada à queda das taxas de sobrevida dos pacientes com cordomas, ou seja, quanto maior a expressão de pAKT, menor é a taxa de sobrevida. De fato, alguns estudos demonstram a forte expressão da proteína em pacientes com cordomas (PRESNEAU et al. 2009; TAMBORINI et al. 2010). TAMBORINI et al. (2010) sugere que a combinação de antagonistas de tirosinas quinases, e inibidores de mTOR e MAPK podem levar a um melhor controle do crescimento do tumor. Entretanto, nenhum estudo associa a expressão de pAKT com sobrevida dos pacientes, tampouco com prognóstico, sendo portanto nossos dados inéditos na literatura.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, podemos afirmar que os receptores de tirosina quinase estão frequentemente expressos em cordomas, sobretudo a expressão de PDGFR- α , PDGFR- β , c-MET e AKT fosforilada, sendo este último um importante marcador associado à sobrevida dos pacientes, representando assim possíveis alvos terapêuticos alternativos para o tratamento dos cordomas.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Os cordomas de nosso estudo se caracterizaram pelo acometimento tanto do sexo masculino quanto feminino, com média de idade de 45 anos. Localizaram-se preferencialmente na região sacrococcígea, seguida da região do clivus. O tratamento cirúrgico foi o de escolha na maioria dos casos. Os pacientes apresentaram uma porcentagem relativamente alta de ocorrência de recidivas, em contrapartida, metástases não foram freqüentes. O tipo histológico mais comum foi o convencional, apresentando como características mais freqüentes a presença de matriz mixóide e pleomorfismo celular.

Cordomas freqüentemente mostraram positividade moderada ou forte para PDGFR- α e β , AKT fosforilada e c-MET, e positividade fraca para c-KIT, c-erbB-2 e EGFR.

Alterações cromossômicas (polissomias) do cromossomo 7 foram encontradas através de FISH, porém alterações gênicas do EGFR ou HER2 não foram detectadas.

A maior expressão de pAKT esteve associada à menor sobrevida em 5 anos dos pacientes com cordomas nas análises univariadas.

O grupo dos tumores primários e recidivados não apresentaram diferenças em relação às características clínicas e histopatológicas. Porém a expressão forte da proteína AKT fosforilada e do PDGFR- α foi mais freqüente nos cordomas primários, e a expressão moderada de PDFGR- α , em cordomas recidivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aishima SI, Taguchi KI, Sugimachi K, et al. c-erbB-2 and c-MET expression relates to cholangiocarcinogenesis and progression of intrahepatic cholangiocarcinoma. **Histopathology** 2002; 40:269-78.

Andrade VP, Cunha IW, Silva ES, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43:55-60.

Baratti D, Gronchi A, Pennacchioli E, et al. Chordoma: natural history and results in 28 patients treated at a single institution. **Ann Surg Oncol** 2003; 10:291-6.

Bhadra AK, Casey AT. Familial chordoma: a report of two cases. **J Bone Joint Surg Br** 2006; 88:634-6.

Brandal P, Bjerkehagen B, Danielsen H, et al. Chromosome 7 abnormalities are common in chordomas. **Cancer Genet Cytogenet** 2005; 160:15-21.

Bisceglia M, D'Angelo VA, Guglielmi G, et al. Dedifferentiated chordoma of the thoracic spine with rhabdomyosarcomatous differentiation. Report of a case and a review of the literature. **Ann Diagn Pathol** 2007; 4:262-73.

Burger PC, Scheithauer BW. **Tumors of the central nervous system**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1994. Tumors of mesenchymal tissue. p.287-316 (AFIP Atlas of Tumor Pathology, Third series, Fascicle 10).

Burger H, den Bakker MA, Kros JM, et al. Activating mutations in c-KIT and PDGFR α are exclusively found in gastrointestinal stromal tumors and not in other tumors overexpressing these imatinib mesylate target genes. **Cancer Biol Ther** 2005; 4:1270-4.

Casali PG, Messina A, Stacchiotti S, et al. Imatinib mesylate in chordoma. **Cancer** 2004; 101:2086-97.

Casali PG, Stacchiotti S, Sangalli C, et al. Chordoma. **Curr Opin Oncol** 2007; 19:367-70

Cell Signaling Technology. **Tyrosine kinase/adaptors**. Available from: <URL: <http://www.cellsignal.com/pathways/tyrosine.jsp>> [2011 jan 12]

Chugh R, Tawbi H, Lucas DR, et al. Chordoma: the nonsarcoma primary bone tumor. **Oncologist** 2007; 12:1344-50.

Crockard HA, Cheeseman A, Steel T, et al. A multidisciplinary team approach to skull base chordomas. **J Neurosurg** 2001; 95:175-83.

Dalprà L, Malgara R, Miozzo M, et al. First cytogenetic study of a recurrent familial chordoma of the clivus. **Int J Cancer** 1999; 81:24-30.

Daniele L, Macrì L, Schena M, et al. Predicting gefitinib responsiveness in lung cancer by fluorescence in situ hybridization/chromogenic in situ hybridization analysis of EGFR and HER2 in biopsy and cytology specimens. **Mol Cancer Ther** 2007; 6:1223-9.

Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. **N Engl J Med** 2002; 347:472-80.

Dobashi Y, Suzuki S, Sugawara H, et al. Involvement of epidermal growth factor receptor and downstream molecules in bone and soft tissue tumors. **Hum Pathol** 2007; 38:914-25.

Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med** 2001; 344:1031-7.

Fasig JH, Dupont WD, LaFleur BJ, et al. Immunohistochemical analysis of receptor tyrosine kinase signal transduction activity in chordoma. **Neuropathol Appl Neurobiol** 2008; 34:95-104.

Fasolo A, Cristiana S. mTOR inhibitors in the treatment of cancer. **Expert Opin Investig Drugs** 2008; 17:1717-34.

Ferraresi V, Nuzzo C, Zoccali C, et al. Chordoma: clinical characteristics, management and prognosis of a case series of 25 patients. **BMC Cancer** 2010; 10:22.

Fleming GF, Heimann PS, Stephens JK, et al. Dedifferentiated chordoma. Response to aggressive chemotherapy in two cases. **Cancer** 1993; 72:714-8.

Forsyth PA, Cascino TL, Shaw EG, et al. Intracranial chordomas: a clinicopathological and prognostic study of 51 cases. **J Neurosurg** 1993; 78:741-7.

Furukawa T, Duguid WP, Kobari M, et al. Hepatocyte growth factor and Met receptor expression in human pancreatic carcinogenesis. **Am J Pathol** 1995; 147:889-95.

Heffelfinger MJ, Dahlin DC, MacCarty CS, et al. Chordomas and cartilaginous tumors at the skull base. **Cancer** 1973; 32:410-20.

Hof H, Welzel T, Debus J. Effectiveness of cetuximab/gefitinib in the therapy of a sacral chordoma. **Onkologie** 2006; 29:572-4.

Horbinski C, Oakley GJ, Cieply K et al. The prognostic value of Ki-67, p53, epidermal growth factor receptor, 1p36, 9p21, 10q23, and 17p13 in skull base chordomas. **Arch Pathol Lab Med** 2010; 134:1170-6.

Hug EB, Slater JD. Proton radiation therapy for chordomas and chondrosarcomas of the skull base. **Neurosurg Clin N Am** 2000; 11:627-38.

Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. **N Engl J Med** 2001; 344:1052-6.

Kelley MJ, Korczak JF, Sheridan E, et al. Familial Chordoma, a tumor of notochordal remnants, is linked to chromosome 7q33. **Am J Hum Genet** 2001; 69:454-60.

Kerr WA, Allen KL, Haynes DR, et al. Letter: Familial nasopharyngeal chordoma. **S Afr Med J**. 1975; 49:1584.

Lagonigro MS, Tamborini E, Negri T, et al. PDGFR alpha, PDGFR beta and KIT expression/activation in conventional chondrosarcoma. **J Pathol** 2006; 208:615-23.

Lindén O, Stenberg L, Kjellén E. Regression of cervical spinal cord compression in a patient with chordoma following treatment with cetuximab and gefitinib. **Acta Oncol** 2008; 48:158-9.

Longoni M, Orzan F, Stroppi M, et al. Evaluation of 1p36 markers and clinical outcome in a skull base chordoma study. **Neuro Oncol** 2008; 10:52-60.

Mazzone M, Comoglio PM. The Met pathway: master switch and drug target in cancer progression. **FASEB J** 2006; 20:1611-21.

McPherson CM, Suki D, McCutcheon IE, et al. Metastatic disease from spinal chordoma: a 10-year experience. **J Neurosurg Spine** 2006; 5:277-80.

Meis JM, Raymond AK, Evans HL, et al. "Dedifferentiated" chordoma. A clinicopathologic and immunohistochemical study of three cases. **Am J Surg Pathol** 1987; 11:516-25.

Miozzo M, Dalprà L, Riva P, et al. A tumor suppressor locus in familial and sporadic chordoma maps to 1p36. **Int J Cancer** 2000; 87:68-72.

Mirra JM, Nelson SD, Della-Roca C, Mertens F. Notochordal tumours: chordoma. In: Fletcher DMC, Krisnan Unni K, Mertens F, editors. **Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press; 2002. p.315-17 (World Health Organization classification of tumours; 4).

Mitelman F, Johansson B, Mertens F. **Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer**. Available from: <URL:<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>>. [2010 fev 4]

Muro K, Das S, Raizer JJ. Chordomas of the craniospinal axis: multimodality surgical, radiation and medical management strategies. **Expert Rev Neurother** 2007; 7:1295-312.

Naka T, Kuester D, Boltze C, et al. Expression of hepatocyte growth factor and c-MET in skull base chordoma. **Cancer** 2008; 112:104-10.

Naka T, Boltze C, Samii A, et al. Expression of c-MET, low-molecular-weight cytokeratin, matrix metalloproteinases-1 and -2 in spinal chordoma. **Histopathology** 2009; 54:607-13.

Ostroumov E, Hunter CJ. Identifying mechanisms for therapeutic intervention in chordoma: c-MET oncoprotein. **Spine (Phila Pa 1976)** 2008; 33:2774-80.

Peña CE, Horvat BL, Fisher ER. The ultrastructure of chordoma. **Am J Clin Pathol** 1970; 53:544-551.

Presneau N, Shalaby A, Idowu B, et al. Potential therapeutic targets for chordoma: PI3K/AKT/TSC1/TSC2/mTOR pathway. **Br J Cancer** 2009; 100:1406-14.

Ruco LP, Ranalli T, Marzullo A, et al. Expression of Met protein in thyroid tumours. **J Pathol** 1996; 180:266-70.

Singhal N, Kotasek D, Parnis FX. Response to erlotinib in a patient with treatment refractory chordoma. **Anti-Cancer Drugs** 2009; 20:953-5.

Snitcovsky I, Brentani MM. Fatores de crescimento. In: Brentani MM, Coelho FRG, Kowalski LP, editores. **Bases da oncologia**. 2 ed. São Paulo: Lemar Livraria; 2003. p.167-76.

Tamborini E, Miselli F, Negri T, et al. Molecular and biochemical analysis of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) B, PDGFRA, and KIT receptors in chordomas. **Clin Cancer Res** 2006; 12:6920-8.

Tamborini E, Virdis E, Negri T, et al. Analysis of receptor tyrosine kinases (RTKs) and downstream pathways in chordomas. **Neuro Oncol** 2010; 12:776-89.

Terada T, Nakanuma Y, Sirica AE. Immunohistochemical demonstration of MET overexpression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and in hepatolithiasis. **Hum Pathol** 1998; 29:175-80.

Unni KK, Inwards CY, Bridge JA, Kindblom LG, Wold LE. **Tumors of the bones and joints. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 2005. Notochordal Tumors; p. 249-60 (AFIP Atlas of Tumor Pathology, Fourth series, Fascicle 2).**

Unni KK, Inwards CY. **Dahlin's bone tumors: general aspects and data on 10,165 cases.** 6th ed. Philadelphia: Williams e Wilkins; 2010. Chordoma; p.248-61.

van Oosterom AT, Judson IR, Verweij J, et al. Update of phase I study of imatinib (STI571) in advanced soft tissue sarcomas and gastrointestinal stromal tumors: a report of the EORTC soft tissue and bone sarcoma group. **Eur J Cancer** 2002; 38 (Suppl 5):S83-7.

Walter BA, Begnami M, Valera VA, et al. Gain of chromosome 7 by chromogenic in situ hybridization (CISH) in chordomas is correlated to c-MET expression. **J Neurooncol** 2011; 101:199-206.

Weinberger PM; Yu Z; Kowalski D, et al. Differential expression of epidermal growth factor receptor, c-MET, and HER2/neu in chordoma compared with 17 other malignancies. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 2005; 131:707-11.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:118-45.

Wojno KJ, Hruban RH, Garin-Chesa P, et al. Chondroid chordomas and low-grade chondrosarcomas of the craniospinal axis. An immunohistochemical analysis of 17 cases. **Am J Surg Pathol** 1992; 16:1144-52.

Yang H, Zhu L, Ebraheim NA, et al. Analysis of risk factors for recurrence after the resection of sacral chordoma combined with embolization. **Spine J** 2009; 9:972-80.

Yang XR, Ng D, Alcorta DA, et al. T (brachyury) gene duplication confers major susceptibility to familial chordoma. **Nat Genet** 2009; 41:1176-8.

ANEXOS

Anexo 1 - Construção do TMA

1. Seleção das áreas do tumor em lâminas de rotina para serem amostradas em blocos de parafina;
2. Obtenção de cilindros de 1,0 mm da área do tumor pelo TMA;
3. Montagem em duplicata em novo bloco de parafina com posição bidimensional separado por espaços de 0,2 mm, determinados e gravados pelo equipamento;
4. Cortes histológicos em diferentes níveis do TMA são feitos a partir do bloco receptor, separados por pelo menos 125 μm de distância entre dois cortes, realizados com um micrótomo manual;
5. Os cortes são transferidos em fita adesiva para lâminas adesivas especiais (Instrumentics Inc., Hackensack, NJ, EUA);
6. Retirada da fita adesiva por exposição à luz ultravioleta;
7. Armazenamento das lâminas cobertas por parafina, embaladas a vácuo e congeladas em freezer a -20°C .

Anexo 2 - Protocolo da técnica de Imunoistoquímica:

1. Desparafinização dos cortes histológicos com 3 µm de espessura, do material incluído em parafina e colocados em lâminas silanizadas ou carregadas eletricamente, e deixado em estufa a 60° C por meia hora*;
2. Incubação em xilol a temperatura ambiente por 5 minutos cada, quatro passagens em etanol (100%, 95%, 70%) por 5 minutos cada e lavagem em água corrente por 5 minutos;
3. Recuperação antigênica por calor em panela de pressão (Eterna[®], Nigro), utilizando-se solução tampão citrato 10 mM pH 6,0 ou solução tampão Tris EDTA 1 mM pH 9,0 à 125°C (30 segundos após atingir 125°C e pressão entre 20 e 25 psi) por 25 minutos**;
4. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada por 5 minutos;
5. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada a 3% (água oxigenada 10 volumes) por 5 minutos;
6. Lavagem das lâminas em Phosphate Buffered Saline (PBS/Tween) por 5 minutos;
7. Bloqueio das proteínas inespecíficas (Protein Block-serum free, DAKO) por 20 minutos;
8. Incubação com anticorpo primário por 2 horas em temperatura ambiente (Ta), em câmara úmida;
9. Lavagem em tampão PBS/Tween por 5 minutos (3 repetições);
10. Incubação com anticorpo secundário não-biotinilado (Advance HRP Link – DAKO) por 30 minutos (Ta);
11. Lavagem em tampão PBS/Tween por 5 minutos sob as mesmas condições citadas no passo 9;
12. Incubação com polímero (Advance HRP Enzyme – DAKO) por 30 minutos;
13. Lavagem das lâminas em PBS/Tween por 5 minutos;

14. Revelação das reações com solução substrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) por 5 minutos, 37° C, ao abrigo de luz (Kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DAKO Cytomation, Carpinteria, Califórnia);
15. Lavagem das amostras em água corrente e destilada por 5 minutos;
16. Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos;
17. Lavagem em água corrente e destilada por 5 minutos;
18. Desidratação das lâminas - 6 passagens em etanol a 50%, 80%, 95% e 100%, sendo três delas em 100%;
19. Montagem das laminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Germany).

Nota: *Foram desparafinizadas na estufa apenas as lâminas de TMA.

**A recuperação antigênica dos marcadores foram feitas com solução tampão citrato, apenas para o anticorpo PDGFR beta a recuperação foi realizada com solução tampão Tris EDTA.

Anexo 3 - Protocolo da técnica de FISH:

- 1 Desparafinização dos cortes histológicos com 3 µm de espessura, incubando as amostras em xilol por 10 minutos, e em seguida em etanol 100%, 95% e 70% por 5 minutos cada;
- 2 Lavagem das lâminas em água corrente e destilada por 5 minutos;
- 3 Incubação das lâminas em HCl 0,2 N por 20 minutos, a temperatura ambiente;
- 4 Aquecimento das lâminas em banho maria no citrato, pH 6,0, a 80° C, durante 1h;
- 5 Incubação das amostras em pepsina por 8 minutos;
- 6 Lavagem das lâminas em solução adstringente por 2 minutos;
- 7 Incubar em álcool 70%, 80% e 100%, respectivamente, por 2 minutos cada;
- 8 Após o secamento das lâminas em temperatura ambiente, aplica-se a sonda. A aplicação da sonda é dividida em 2 etapas: Co-denaturação - 82° C por 5 minutos; Hibridização - 45° C por 18 horas;
- 9 Incubação das lâminas em banho maria em uréia, a 45° C, por 30 minutos;
- 10 Lavagem das lâminas em solução adstringente por 2 minutos;
- 11 Desidratação das amostras: Incubação em álcool 70%, 80% e 100% respectivamente, por 2 minutos cada;
- 12 Secagem das lâminas em temperatura ambiente, no escuro;
- 13 Montagem da solução fluorescente, DAPI (do inglês, 4,6'-diamino-2-phenylindole);
- 14 Secagem das lâminas em temperatura ambiente, no escuro.

Anexo 4 - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do A.C. Camargo.



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 06 de Maio de 2009.

À
Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1228/09
"Estudo dos receptores de tirosina quinase em cordomas".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 28/04/2009, aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do CNS;
- Termo de dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

**Fundação Antonio Prudente
Comitê de Ética em Pesquisa**

Parecer Consubstanciado

Projeto: 1228/09

Título: "Estudo dos receptores de tirosina quinase em cordomas".

Pesquisador Responsável: Dra. Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami

Aluna: Carolina Vieira de Castro (Mestrado)

Patrocinador: Será submetido à FAPESP

Análise da proposta:

Trata-se de estudo retrospectivo que analisará 78 casos entre os anos de 1980 e 2005 no Hospital A.C. Camargo, identificados a partir do banco de dados do Departamento de Anatomia Patológica.

A introdução do projeto é clara, porém a revisão da literatura poderia ser mais extensa. No entanto, os objetivos são precisos, de interesse e factíveis. A extensa revisão clínico patológica e o estudo da expressão das proteínas selecionadas pode além de permitir as correlações propostas também ser utilizada para a exploração de fatores preditivos de recorrência e possivelmente de sobrevida livre de doença e global. A proposta inclui a confecção de lâminas para avaliação das expressões imunoistoquímicas e os casos classificados com escore 2 para c-erbB-2 e escore 2 ou 3 para EGFR serão selecionados para realização do FISH. A análise estatística proposta é adequada e contempla análise de sobrevida.

Foi apresentado orçamento e toda a documentação pertinente. Por tratar-se de estudo retrospectivo em que será mantida em sigilo a identidade do paciente pode-se aceitar a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido.

Considerando-se a relevância do estudo, recomendamos sua provação na forma como foi apresentado.

Análise da Comissão de Ensino e Pesquisa – CENP: Projeto Aprovado.

Parecer Final:

Projeto Aprovado


FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital do Câncer A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador