

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE
PROTEÍNAS DA VIA DE SINALIZAÇÃO MEDIADA POR TGFB
COMO PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA PRÉ-
OPERATÓRIA EM ADULTOS PORTADORES DE SARCOMA
DE PARTES MOLES DE ALTO GRAU EM EXTREMIDADES**

**RANYELL MATHEUS SPENCER
SOBREIRA BATISTA**

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

**Co-Orientadores: Dr. Samuel Aguiar Júnior
Dra. Isabela W. da Cunha**

**São Paulo
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Spencer, Ranyell Matheus Sobreira Batista

Avaliação da expressão proteica de genes pertencentes a via de sinalização mediada por TGF β como preditores de resposta à quimioterapia pré-operatória com doxorrubicina e ifosfamida em adultos portadores de sarcoma de partes moles de alto grau em extremidades / Ranyell Matheus Spencer Sobreira Batista – São Paulo, 2013.

111p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Ademar Lopes

Descritores: 1. QUIMIOTERAPIA 2. SARCOMA/cirurgia. 3. FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA. 4. EXTREMIDADES.

“Pois não é suficiente ter o espírito bom, o principal é aplicá-lo bem. As maiores almas são capazes dos maiores vícios, tanto quanto das maiores virtudes, e os que só andam muito lentamente podem avançar muito mais, se seguirem sempre o caminho reto, do que aqueles que correm e dele se distanciam.”

Discurso do Método (René Descartes, 1637).

DEDICATÓRIA

À minha família, Hérbat Spencer, Ismênia Gildeth, Sarah Jamylle, Hysaac Manuel, Maria Clara, Bárbara Izabel. Aos meus avós Sebastião Batista, Maria das Neves, Maria Gildeth Sobreira e Manoel Domingos. Em especial à minha filha Raquel, meu tesouro vivo na Terra.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor, orientador e tutor, Prof. Dr. Ademar Lopes, pelo exemplo de dedicação, empenho, luta e sabedoria. Pela oportunidades geradas, pelas orientações passadas e muito mais pelas cobranças sabidamente no intuito de que eu melhore e avance. Agradeço a confiança passada desde o início e o entusiasmo pela Ciência e Ensino.

Aos meus co-orientadores Dra. Isabela Werneck da Cunha e Dr. Samuel Aguiar Jr., pela liberdade e confiança em acreditar que esta tese nasceria do berço de seus trabalhos seguindo um caminho reto e limpo no estudo de sarcomas.

Aos colegas do Departamento de Oncologia Clínica, na pessoa do Dr. Celso de Mello, que esteve sempre conosco nessa luta diária a favor da vida.

Ao Departamento de Anatomia Patológica, em especial ao Prof. Dr. Fernando Soares, pelo incentivo e colaboração na realização desse projeto.

Aos meus residentes de cirurgia do Hospital A.C.Camargo, que muito mais me ensinam do que os leciono. Também pelos momentos de descontração que encontro em muitos deles, fazendo do dia a dia algo mais leve e divertido.

A todos os professores e colegas do curso de Pós-Graduação, assim como aos funcionários da Biblioteca representados aqui por Suely. Às funcionárias da Pós-Graduação, Ana, Luciana, Vanusa e Cinthia.

Aos meus amigos, em especial, Thiago Santana e Tiago Santoro que, durante a residência, possibilitaram minha ausência despercebida pela dedicação aos pacientes e apoio à minha caminhada nesse projeto, e ao amigo Wilson Costa, pelo apoio e paciência com os cálculos estatísticos desta tese.

Ao amigo Fábio Ferreira, pelo exemplo profissional e de amizade. Agradeço cada oportunidade dada e reconhecimento.

A Maria e Irene, minhas mães de aluguel que até hoje estão presentes em mim com pensamentos bons e orações.

Ao meu pai, Hérbat Spencer, que sempre me deu a liberdade de buscar meus objetivos e lutar pelos meus sonhos, desde que com responsabilidade, que foi exemplo de pai e amigo. Homem dedicado, honesto, trabalhador e sensível. Obrigado.

A minha mãe, Ismênia Gildeth, que, mesmo em seu silêncio, torce e vibra com minhas conquistas, reconhece meus erros e ameniza-os com o carinho que toda mãe deve ter.

A Hysaac, meu irmão, que sei da responsabilidade que tenho em sua vida como exemplo por ser o mais velho. Pelo respeito que tem por mim, admiração e afeto evidentes. Pela alegria em viver junto às minhas conquistas.

A Maria Clara, minha irmã, pelo carinho, respeito e confiança em mim. Pelo afeto de irmã e amiga. Pelo orgulho de sermos irmãos.

A minha irmã Sarah, meu anjo protetor, irmã querida por todos nós. Companheira, confidente e amiga. Admirada pela força e disposição em viver. Obrigado minha irmã. Agradeço a Deus todos os dias por colocá-la na minha vida.

A minha irmã Bárbara, simplesmente por ser criança e alegrar a nós todos.

A minha filhinha, Raquel. Que compreenda as decisões tomadas por mim nessa fase de minha vida. Que supere a distância. Que continue com seu sorriso lindo e fácil. Que continue com sua doçura, mas que seja criada para enfrentar o mundo afora. Seja sempre saudável e feliz.

A Louise que aceitou o desafio do recomeço. Que lutou junto, que sofreu junto, mas não desistiu. Que Sonha junto; quer junto. Que acredita.

Aos professores da UFRN, em especial Dr. Edilson Pinto, por suas palavras sensatas e que acalmam a alma. Aos professores e amigos Francisco Diniz e Roberto Galvão pelas primeiras orientações na técnica cirúrgica na vida profissional.

A todos que contribuíram, a seu modo, na minha trajetória. Amigos e inimigos que me fazem querer ser cada vez melhor como espírito, reconhecer meus erros e corrigi-los em busca da bondade, da responsabilidade, do respeito e do amor pelo que faço e pelas pessoas, das quais sou responsável.

Finalmente, a CAPES e FAPESP que proporcionaram a realização deste trabalho.

RESUMO

Spencer RM. **Avaliação da expressão imunoistoquímica de proteínas da via de sinalização mediada por TGF β como preditores de resposta à quimioterapia pré-operatória em adultos portadores de sarcoma de partes moles de alto grau em extremidades.** São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Sarcomas de partes moles (SPM) constituem um grupo de neoplasias raras de comportamentos distintos. O tratamento para os tumores de alto grau, não passíveis de ressecção adequada, é feito por cirurgia, radioterapia (RT) e quimioterapia (QT). Apesar disso, 50% dos pacientes com tumores localizados ao diagnóstico morrem da doença metastática. A QT pré-operatória para o tratamento de tumores localizados, apesar de não ser considerada como padrão, é uma opção promissora. A escassez de preditores biológicos de resposta, e achados de que a superexpressão de genes pertencentes à via mediada por TGF β estaria relacionada à resistência à QT nos levaram à tentativa de estabelecer a relação entre a expressão de FST, SMAD4, TGF β e Id com resposta patológica. **Objetivos:** Avaliar por imunoistoquímica (IQ) a expressão das proteínas produzidas a partir dos genes TGFB, FST, Id1 e SMAD4 da via mediada por TGF β , correlacionando com a resposta patológica; expandir os resultados clínicos do esquema de QT pré-operatória com doxorrubicina e ifosfamida em vigência no Hospital A.C. Camargo; determinar as taxas de toxicidade e avaliar um método de análise patológica que quantifique a porcentagem de células tumorais viáveis em peça operatória. **Pacientes e Métodos:** 42 pacientes com SPM de alto grau localizados em extremidades, tratados com doxorrubicina e ifosfamida pré-operatória, foram observados de forma prospectiva, desde janeiro de 2005 a agosto de 2012. Amostras das biópsias e das peças operatórias foram obtidas e submetidas à pesquisa da expressão das proteínas já referidas por IQ. **Resultados:** A expressão das

proteínas estudadas não teve correlação estatisticamente significativa com a resposta patológica. A taxa de resposta clínica objetiva sobre o tumor primário foi de 17,5%; e a de resposta patológica completa foi de 15%. Três pacientes (7,5%) tiveram o membro amputado. A toxicidade graus 3-4 se deu em 45,2% dos casos. **Conclusão:** O método de análise patológica proposto mostrou-se seguro e de fácil aplicabilidade clínica; as proteínas estudadas pertencentes à via do TGFB não se correlacionaram com a resposta patológica. O esquema de QT proposto é seguro e mostrou-se capaz de manter taxas de preservação de membros.

SUMMARY

Spencer RM. **[Protein expression evaluation of protein of genes belonging to the TGF β pathway as predictors of response to preoperative chemotherapy with doxorubicin and ifosfamide in adult patients with high grade soft tissue sarcomas located in extremities]**. São Paulo; 2013. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Background: Soft Tissue Sarcomas (STS) are rare neoplasms with many histological subtypes, behaviors and response to different treatments. The treatment of these tumors involves surgery, radiation and chemotherapy. Despite that 50% of patients with localized tumors will develop metastatic disease. Preoperative chemotherapy (CT) although not standard is considered a promising therapeutic option. The lack of biological predictors of response, led us to study the relationship between the expression of FST, SMAD4, TGF β and Id (TGF β superfamily genes) in patients submitted to preoperative CT. **Objectives:** To evaluate the protein expression. Produced by genes belonging to the TGF β pathway by IH and correlate it with pathologic response; expand the preliminary results of a previous phase II trial testing a schedule of preoperative CT with doxorubicin and ifosfamide in Hospital A.C. Camargo; determine the rate of toxicity and evaluate a method of assessing pathological analysis that quantifies the percentage of viable tumor cells in surgical specimens. **Patients and Methods:** 42 patients with high grade STS located in extremities treated with preoperative doxorubicin and ifosfamide CT were observed prospectively, on a non controlled fashion since January 2005 to august 2012. Biopsies and surgical specimens were obtained to enable the analysis of TGF β , FST, SMAD4 and Id protein expressional by immunohistochemistry (IH). **Results:** The expression of the proteins studied had no significant association with pathological response. The objective response rates of the primary tumor were 17.5% for clinical response and 15% for pathologic complete response. Only 7.5% patients had

a limb amputated. The rate of surgical contraindication was 4.7%. Grade 3-4 toxicity occurred in 45.2% of cases. Conclusion: The method of pathological response analysis was considered easily applicable. TGF β -mediated pathway proteins studied did not correlate with pathological response. The protocol of QT proposed is safe and was capable to maintain the rates of limb salvage comparable to those previous reported.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Resultado da análise realizada a partir do aplicativo “Pathway express” a partir do banco de genes Kegg.....	15
Figura 2	TGF β e sua ambiguidade na promoção ou supressão tumoral...	17
Figura 3	Visão geral da via de sinalização mediada por TGF β no câncer.	20
Figura 4	Modelo esquemático mostrando os efeitos do Id na transcrição bHLH.....	23
Figura 5	Fotografia colorida do fragmento central de uma peça operatória e lâminas de microscopia.....	32
Figura 6	Fotomicrografia de sarcoma sinovial representando fragmento de peça operatória dos pacientes submetidos QT pré-operatória.	33
Figura 7	Avaliação de resposta clínica (RECIST).....	35
Figura 8	Representação esquemática do protocolo de tratamento para SPM de alto grau em extremidades, não passível de ressecção adequada adotado no Hospital A.C.Camargo.....	36
Figura 9	Curvas de SG e SLRD para os pacientes não metastáticos (n=33) (A e B), e de SG para os pacientes metastáticos (n=9) (C).....	44
Figura 10	Curva de SG para os 42 pacientes submetidos à QT pré-operatória, de acordo com a presença ou não de metástases ao diagnóstico.....	45

Figura 11	Curvas de SG (A) e SLRD (B) para 32 pacientes não metastáticos, portadores de SPM de alto grau em membros, submetidos à QT pré-operatória, de acordo com a resposta clínica (RECIST).....	47
Figura 12A	Curvas de SG (A) e SLRD (B) para 31 pacientes não metastáticos, submetidos à QT pré-operatória, de acordo com a percentagem de células viáveis na peça operatória - ponto de corte 5%.....	52
Figura 12B	Curvas de SG (A) e SLRD (B) para 31 pacientes não metastáticos, submetidos à QT pré-operatória, de acordo com a percentagem de células viáveis na peça operatória - ponto de corte 10%.....	53
Figura 12C	Curvas de SG (A) e SLRD (B) para 31 pacientes não metastáticos, submetidos à QT pré-operatória, de acordo com a percentagem de células viáveis na peça operatória - ponto de corte 30%.....	54
Figura 13	Curva de SLRD para os pacientes não metastáticos (n=33), de acordo com as margens microscópicas livres e amplas vs. livres e exíguas.....	57
Figura 14	Curvas de SG (A) e SLRD (B) para os pacientes não metastáticos (n=33), de acordo com o tamanho.....	59
Figura 15	Curvas de SG (A) e SLRD (B) para os pacientes não metastáticos (n=32), de acordo com a resposta clínica avaliada pelo RECIST (reposta parcial vs. progressão de doença).....	61

Figura 16	Fotomicrografia de (A e B) sarcoma pelomórfico e (C e D) sarcoma sinovial com relação à expressão imunohistoquímica para o Ac TGFβ em biópsia (pré-tratamento com QT) e peça cirúrgica (pós-tratamento com QT) (40X).....	66
Figura 17	Fotomicrografia de sarcoma fusocelular com relação à expressão imunohistoquímica nuclear para o Ac Id1 (A – 10X e B – 40X).....	67
Figura 18	Fotomicrografia de sarcoma sinovial com relação à expressão imunohistoquímica para o Ac FST (10X).....	68
Figura 19	Fotomicrografia de sarcoma fusocelular com relação à expressão imunohistoquímica para o Ac SMAD4 (A – 10X e B – 40X).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos anticorpos primários utilizados, diluições, fabricantes e clones utilizados nas reações de imunohistoquímica.....	39
Tabela 2	Frequência das variáveis clínicas e relativas ao tumor (n=42)	42
Tabela 3	Frequência dos dados referentes a quantidade de ciclos, resposta clínico/patológica e toxicidade do esquema de QT pré-operatória.....	49
Tabela 4	Frequência de toxicidade hematológica e não hematológica, relacionadas ao uso de QT pré-operatória.....	50
Tabela 5	Distribuição dos dados de SG e SLRD para os pacientes não metastáticos ao diagnóstico (n=33), distribuídos de acordo com a percentagem de células viáveis da peça operatória.....	51
Tabela 6	Distribuição dos 40 pacientes que foram operados após o tratamento com QT pré-operatória, segundo o tipo de cirurgia realizada, frequência das complicações de ferida operatória (FO), frequência de pacientes que receberam RT adjuvante e do número de pacientes que evoluíram com recorrência local ou à distância.....	56
Tabela 7	SG e SLRD para os pacientes não metastáticos ao diagnóstico (n=32), relacionadas com a quantidade de ciclos de QT realizado, dados clínicos e de resposta clínica.....	62

Tabela 8	Variáveis clínicas, distribuídas de acordo com a resposta patológica (percentagem de células viáveis na peça operatória) para os pacientes não metastáticos ao diagnóstico (n=33).....	63
Tabela 9	Distribuição dos 40 pacientes foram operados após o tratamento de QT pré-operatória, quanto à expressão das proteínas TGF β , Id1, FST e SMAD4, comparando as amostras de biópsia vs. peça operatória.....	64
Tabela 10	Casos categorizados quanto à expressão das proteínas TGF β , Id1, FST e SMAD4, distribuídos de acordo com a resposta patológica (amostras de biópsia).....	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS	American Cancer Society
AJCC	American Joint Committee on Cancer
bHLH	Basic Helix-Loophelix
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
CEC	Carcinoma Espinocelular
CTV1	Clinical Target Volume ₁
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Estadio Clínico
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ERCC	Excision Repair Cross-Complementing
FDG	Fluorodesoxiglicose
FISH	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante
FSP	FSH-Suppressing Protein
FST	Follistatin
GDF	Growth Differentition Factors
GIST	Tumor estromal gastro intestinal
GTP	Guanosina Trifosfato
HHV-8	Herpes Vírus Humano Tipo8
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus Linfotrópico da Célula Humana
Id	Inhibitors of Differentiation or Inhibitors of DNA Binding
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IQ	Imunoistoquímica
ISS	Italian Sarcoma Group
MAPk	Mitogen Activated Protein Kinases
MDR	Multidrug Resistance
PET_CT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Prótons
PTV1	Planning Target Volume ₁

QT	Quimioterapia
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RM	Ressonância Magnética
RT	Radioterapia
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SG	Sobrevida Global
SLR	Sobrevida Livre de Recorrência
SLRD	Sobrevida Livre de Recorrência à Distância
SLRL	Sobrevida Livre de Recorrência Local
SMAC	Sarcoma Meta-Analysis Collaboration
SPM	Sarcoma de Partes Moles
TC	Tomografia Computadorizada
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
TOPO2a	Topoisomerase 2a
TβR	Transforming Growth Factor Beta Receptor
X²	Teste de QUI-Quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia e diagnóstico	1
1.2	Tratamento e revisão da literatura	2
1.3	Experiência do Hospital A.C. Camargo	10
1.4	Marcadores moleculares relacionados a prognóstico e à resposta terapêutica	12
1.5	Via mediada por TGFB – marcadores TGFB, SMAD4, ID1 e FST	16
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo primário	26
3.2	Objetivos secundários	26
4	MÉTODOS	27
4.1	Crerérios de inclusãõ	27
4.2	Crerérios de exclusãõ	28
4.3	Variáveis clínicas e patológicas coletadas	28
4.4	Financiamento e aprovaçãõ pelo comitê de ética em pesquisa	30
4.5	Coleta de material para armazenamento e análise histopatológica	30
4.6	Estadiamento dos tumores	33
4.7	Quimioterapia e avaliaçãõ de resposta clínicã	34
4.8	Radioterapia pós-operatória	37
4.9	Avaliaçãõ dos resultados de imunoistoquímica	38
4.10	Análise estatística	39
5	RESULTADOS	41
5.1	Variáveis clínicas e referentes ao tumor	41
5.2	Realizaçãõ da quimioterapia, resposta clínicã e toxicidade	46

5.3	Resposta patológica	51
5.4	Cirurgia, complicações e radioterapia	55
5.5	Expressão imunoistoquímica das proteínas TGFB SMAD4, ID1 e FST	63
5.5.1	TGFB	64
5.5.2	Id1	66
5.5.3	FST	67
5.5.4	SMAD4 (nuclear)	69
6	DISCUSSÃO	71
6.1	Resposta anatomopatológica	76
6.2	Marcadores imunoistoquímicos	80
6.3	Resposta clínica	83
6.4	Quimioterapia e toxicidade	86
6.5	Aspectos cirúrgicos	89
7	CONCLUSÕES	93
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ANEXOS

- Anexo 1** Protocolo-Laudo de Anatomia Patológica Sarcomas/Partes moles (Biópsia)
- Anexo 2** Ficha para coleta de dados
- Anexo 3** Protocolo de Imunoistoquímica padronizado (Adaptado Envision Flex/HRP)
- Anexo 4** Marcadores Imunoistoquímicos - Informações técnicas
- Anexo 5** Termo de Consentimento ao Ensaio Clínico e Estudo molecular
- Anexo 6** Documento de aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa-Hospital A.C.Camargo

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA E DIAGNÓSTICO

Sarcomas de partes moles (SPM) constituem um grupo de neoplasias raras respondendo por 1% dos casos de tumores sólidos em adultos. Nos Estados Unidos são estimados, para 2013, 11.410 novos casos, incluindo adultos e crianças, com cerca de 4.390 óbitos esperados (American Cancer Society – ACS 2013). Não existem dados na literatura demonstrando a estimativa do Brasil. Por inferência com a população americana pode-se estimar uma incidência anual de 7.060 casos para o mesmo ano. Os fatores de risco relacionados aos sarcomas são: exposição a radiação ionizante; síndromes genéticas, como, por exemplo, neurofibromatose, Li-Fraumeni e esclerose tuberosa; linfedema crônico; exposição a arsênio e herbicidas, além de infecção por HIV, HTLV1 e HHV-8 (BRENNAN et al. 2008).

São tumores localizados, principalmente, nos membros (cerca de 50%-60% dos casos) (CORMIER e POLLOCK 2004). Originam-se de células mesenquimais primitivas, que se diferenciam em mais de 50 subtipos histológicos com graus de diferenciação divididos em baixo, intermediário e alto (CORMIER e POLLOCK 2004). Muitos deles ocorrem em idades específicas, sem uma localização pré-determinada. Em crianças, o tipo mais comum é o rabdomyossarcoma embrionário e, nos adultos, o sarcoma pleomórfico, seguido do lipossarcoma e leiomyossarcoma (JONES et al.

2012). Os sarcomas de alto grau, maiores de 5cm e profundos, têm um comportamento não só de agressividade local mas também de enviarem metástases à distância, principalmente pulmonares. O risco de metástase pulmonar, para tumores de alto grau, varia de 34% nas lesões de 5-10cm e 43% para aquelas maiores que 10cm (COINDRE et al. 2001; ZAGARS et al. 2003; EILBER et al. 2003).

O diagnóstico, muitas vezes, é tardio, com a evidência de alguma massa tumoral palpável no membro afetado ou por sintomas neurológicos, como disestesias e dor local. As lesões retroperitoneais são assintomáticas por longos períodos, sendo o seu diagnóstico dado, muitas vezes, por achados incidentais em exames de rotina (JONES et al. 2012).

1.2 TRATAMENTO E REVISÃO DA LITERATURA

O tratamento para os casos de SPM localizados, mas não passíveis de ressecção adequada é, na maioria das vezes, multimodal e envolve frequentemente a cirurgia, quimioterapia (QT) e radioterapia (RT). O momento ideal para a realização dessas terapias ainda é discutível (LOPES et al. 1999; KHANFIR et al. 2003; PISTERS et al. 2007).

A cirurgia associada à RT é a principal modalidade terapêutica, alcançando elevadas taxas de preservação de membros, tanto pelos avanços técnicos e abordagens multiprofissionais quanto pelo aprimoramento das próprias técnicas de radioterapia (LINDBERG et al. 1981). Com o advento da RT, houve um melhor controle local com cirurgias

menores com um conseqüente aumento nas taxas de preservação de membros, mas sem melhora na sobrevida global (SG), já que os pacientes continuaram a morrer da doença metastática, principalmente pulmonar. (LINDBERG et al. 1981; ROSENBERG et al. 1982).

Diante de um paciente com diagnóstico de sarcoma localizado e de alto risco (tumores maiores que 5cm, alto grau de diferenciação celular e profundos), a terapia sistêmica deve ser considerada. Nesse sentido, a QT, associada ou não à RT, vem sendo aplicada principalmente de modo adjuvante (CHANG et al. 1988; BRENNAN et al. 1991), no intuito de melhorar os índices não só de controle local mas também da doença à distância.

Dentre as duas modalidades de terapia a serem oferecidas, adjuvante ou neoadjuvante, esta última é priorizada em pacientes com tumores grandes e de localização desfavorável à ressecção adequada, em que possa haver diminuição do tamanho deste, facilitando a cirurgia, em relação à margem de ressecção, sem comprometer os preceitos oncológicos de ressecção tridimensional com margens livres (REYNOSO et al. 2010), e que possa ser efetiva em aumentar a sobrevida, presumidamente por combater de forma precoce as micrometástases.

No entanto, esses conceitos são teóricos tendo as terapias, neoadjuvante ou adjuvante, o mesmo potencial de eficácia, diferindo apenas quanto à relação temporal de sua aplicabilidade em relação ao tratamento principal, ou seja, antes ou após a cirurgia ou RT definitiva. Diante desses conceitos, analisam-se em conjunto alguns estudos considerados de suma

importância sobre o tema e que mostraram algum benefício clínico nesse âmbito de tratamento multimodal.

O primeiro deles foi publicado na revista *Lancet* em 1997 (SMAC – *Sarcoma Meta-Analysis Collaboration*). Esse trabalho envolveu 14 *trials* com um total de 1.568 pacientes que foram randomizados para receber QT baseado em doxorrubicina vs. cirurgia apenas (Anonymous 1997). Apesar de diminuir a sobrevida livre de recorrência local (SLRL) e à sobrevida livre de recorrência à distância (SLRD), a melhor em SG não foi estatisticamente significativa (4%; $P=0,12$). Críticas a esse trabalho são direcionadas aos critérios de seleção dos pacientes. Os muitos tipos histológicos com variados grupos de risco, potencialmente minimizaram qualquer efeito adjuvante da QT. No entanto, analisando o subgrupo de pacientes com tumores de alto grau em extremidades, constatou-se uma melhora na SG de 8%, agora significativa ($P=0,029$). Em 2008 foi publicada na revista *Cancer* uma atualização dos dados desse estudo (PERVAIZ et al. 2008), com a adição de trezentos e oitenta e cinco (385) pacientes e a incorporação da Ifosfamida ao esquema terapêutico. Os resultados desse trabalho mostraram, de forma mais evidente, um benefício com o uso da QT adjuvante com uma redução de risco de 27% ($HR=0.73$; $IC95\%=0.56-0.95$) para SLRL; 35% ($HR=0.65$; $IC95\%=0.53-0.80$) para SLRD; e de 33% ($HR=0.67$; $IC95\%=0.56-0.82$) para SG. E mais, a associação da doxorrubicina com a ifosfamida melhorou significativamente a SG, com redução do risco de óbito de 44% ($HR=0,56$; $IC95\%=0.36-0.85$; $P=0,01$) para os pacientes tratados.

O *Italian Sarcoma Group* (ISS) conduziu um segundo estudo que

também mostrou benefício com o uso de QT adjuvante em sarcomas FRUSTACI et al. (2001) mostraram, avaliando apenas pacientes com tumores de alto grau de diferenciação celular e de estado clínico (EC) III (FLEMING et al. 1997), localizados em extremidades (n=104), baseando-se nos achados do SMAC, que o esquema com epirrubicina (60 mg/m² nos dias 1 e 2, totalizando 120 mg/m² por ciclo), e ifosfamida (1,8 g/m², nos dias 1 a 5, totalizando 9 g/m² por ciclo) melhorava as taxas SLRD, quando comparado com o grupo - controle (85 vs. 72%) nos 2 primeiros anos de seguimento.

No entanto, esse benefício se perdeu após 4 anos de seguimento, em que as taxas de SLRD foram de 44% vs. 45%, respectivamente. Inexplicavelmente a SG foi melhor no grupo de QT adjuvante (69 vs. 50%; P=0,04). Um seguimento mais longo, de 89,6 meses, manteve esse benefício (66.0 vs. 46.1%; P=0.04), o que representou um aumento em 2 anos de 13% e de 19% em 4 anos na SG (p=0,04) (BRAMWELL 2001; FRUSTACI et al. 2003).

O próprio ISS atentou para o fato de que muitos dos pacientes não receberam os dois últimos ciclos de QT previstos no protocolo inicial por queda de *performance* clínica. Isso gerou a hipótese de que os três primeiros ciclos eram os de ação mais significativa para o ganho de sobrevida. A partir dessa hipótese, foi publicado em 2012 um trabalho comparando a eficácia de 3 vs. 5 ciclos de QT, sendo os três primeiros realizados de modo neoadjuvante em ambos os braços. As características dos pacientes eram as mesmas anteriormente descritas, com um total de

160 em cada braço. Foi usado o mesmo regime de QT: epirrubicina (120mg/m²/ciclo) e ifosfamida (9g/m²/ciclo). A RT foi aplicada de modo neoadjuvante na metade dos pacientes. A partir da análise por intenção de tratamento, não houve diferença entre 3 ou 5 ciclos de QT. Além disso os autores concluíram que a QT, quando oferecida de modo neoadjuvante, pode contribuir para um melhor controle local com maior taxa de preservação e função do membro (GRONCHI et al. 2012).

Um estudo retrospectivo, não randomizado realizado por CORMIER et al. (2004) demonstrou dados contrários aos até aqui expostos, ao verificar que nos pacientes que receberam QT adjuvante (n=337) em relação ao grupo-controle (n=337), todos com sarcoma de alto grau e EC III, o benefício em sobrevida se deu apenas no primeiro ano de seguimento. Esse achado pode ser justificado pelo fato de que os pacientes com tumores maiores, em sua maioria, pertenciam ao braço que recebeu QT, além de o esquema de QT não ter sido padronizado em termos de tipo de droga utilizada e de quantidade de ciclos.

Também de modo adverso, aos bons resultados discutidos anteriormente, a *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC 62771), avaliou um conjunto de 468 pacientes os quais foram randomizados entre QT adjuvante (ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina e dacarbazina) vs. cirurgia apenas (PINEDO et al. 1979), e outros 351 pacientes (EORTC 62931) tratados com doxorubicina e ifosfamida também vs. cirurgia (WOLL et al. 2007). Ambos os estudos não revelaram benefício com o uso da QT, ainda que subdividindo os grupos por

grau de diferenciação celular e tipo histológico. Esses achados negativos podem ter sido atribuídos à inclusão de pacientes com tumores de baixo risco (6% baixo grau e 60% menores que 10cm), além da dose relativamente baixa de ifosfamida aplicada ($5\text{g}/\text{m}^2/\text{ciclo}$). Apesar disso, foi observado que, para os pacientes com ressecção considerada R1 (margens microscópicas positivas), os resultados de SLRL e SG foram melhores.

Muitos protocolos de neoadjuvância em sarcomas têm empregado a QT concomitante à RT com o objetivo de aumentar a eficácia da RT sobre o tumor; é o que se denomina QT radiosensibilizante. A maioria desses esquemas usa a doxorrubicina como droga padrão. Revisões não sistemáticas apontam para taxas de controle locorregionais, com essa associação, superiores aos resultados históricos de radioterapia adjuvante isolada. No entanto, foram constatados elevados índices de complicações pós-operatórias, oscilando entre 26% e 30% (PISTERS 1998; 1999; PISTERS et al. 2002).

O *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) realizou um ensaio clínico multi-institucional fase II (RTOG 9514), com objetivo de validar a efetividade do esquema com QT e RT (KRAYBILL et al. 2006). Sessenta e quatro pacientes portadores de SPM de alto grau ou maiores que 8 cm, localizados em extremidade ou tronco, foram estudados. Os pacientes receberam uma dose total de 44Gy de RT pré-operatória associada à QT que foi oferecida tanto de modo neoadjuvante como adjuvante, totalizando 4 ciclos. As drogas utilizadas foram doxorrubicina ($60\text{mg}/\text{m}^2/\text{ciclo}$), ifosfamida ($7.500\text{ mg}/\text{m}^2/\text{ciclo}$) e dacarbazina $675\text{ mg}/\text{m}^2/\text{ciclo}$.

As estimativas de sobrevida livre de recorrência local (SLRL), SLRD e SG foram, respectivamente, 56,6%, 64,5% e 75,1% em 3 anos. Esses resultados foram severamente criticados, particularmente em relação às elevadas taxas de complicações e óbitos em razão de o esquema ser considerado altamente tóxico (PISTERS 2006).

Quanto aos dados de literatura relacionados com QT neoadjuvante exclusiva, um trabalho randomizado relacionou essa terapia com dados de SG e sobrevida livre de recorrência (SLR) (EORTC 62874) (GORTZAK et al. 2001). Foram randomizados 134 pacientes de alto risco de recidiva (tumor maior que 8cm de qualquer grau, menor que 8cm de alto grau, ou ambos quando residual ou recidivado), tendo 67 em cada braço. Utilizou-se como quimioterápicos a doxorrubicina (50 mg/m² no dia 1) e a ifosfamida (5 g/m² em infusão contínua) no grupo estudado vs. o grupo-controle que foi submetido apenas à cirurgia. Pacientes submetidos à ressecção do tumor com margens inadequadas receberam RT pós-operatória. Dos pacientes randomizados para receber QT 87% completaram os três ciclos previstos no protocolo. O uso da QT foi relacionado com uma melhor SG (56% vs. 52%), no entanto, sem significância estatística. Um benefício estimado de SG em 5 anos foi de 15%, se considerado um n=269. O tratamento neoadjuvante não comprometeu a realização das outras modalidades de tratamento subsequentes (cirurgia e RT), com taxas semelhantes de complicações locais pós-operatórias. Em função da dificuldade e demora no recrutamento de pacientes, os investigadores não estenderam o estudo para fase III (GORTZAK et al. 2001).

Um outro estudo negativo quanto à neoadjuvância foi realizado pelo *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (GROBMYER et al. 2004). De modo retrospectivo, os investigadores avaliaram 74 pacientes tratados com doxorubicina (75 mg/m²/ciclo) e Ifosfamida (6-9 g/m²/ciclo) neoadjuvante vs. 282 que foram submetidos apenas à cirurgia. Todos os pacientes estudados eram portadores de SPM de alto grau, maiores que 5cm, localizados em extremidades e de EC III. Apesar dos resultados não favorecerem o uso de QT neoadjuvante, para uma análise de subgrupo envolvendo pacientes com tumores maiores que 10cm, houve um benefício, estimado para 3 anos, de 21% quanto à sobrevida específica por câncer (SEC) favorecendo o uso de QT, no entanto, sem afetar a SLRD (GROBMYER et al. 2004).

Na década de 1990, uma série de estudos encabeçados pelo *Washington Cancer Institute* avaliando que a ação da QT neoadjuvante em pacientes portadores de SPM foi animadora. Trinta e três pacientes foram submetidos à QT neoadjuvante, administrada tanto por via endovenosa, como intra-arterial, seguida de cirurgia. O objetivo inicial era evitar amputações em pacientes com extensas lesões em locais de difícil abordagem cirúrgica, não passíveis de preservação do membro (HENSHAW et al. 2001). Elevadas taxas de SLRD e SG, 80% em 5 anos, para ambas, foram encontradas, mesmo diante do fato de que todos os pacientes não eram passíveis de ressecção com margem adequada na avaliação inicial. Tais resultados impulsionaram o uso da terapia neoadjuvante em sarcoma, questionando, inclusive, a necessidade de RT adjuvante nos pacientes que

tiveram boa resposta à QT.

No entanto, o que se pode concluir até o momento é que, se há benefício com o uso de QT, tanto num cenário adjuvante quanto neoadjuvante, este parece ser restrito a pacientes com tumores de extremidades de alto risco para recorrência, ou seja, maiores que 10cm, EC III e de alto grau, devendo a RT ser mantida ainda como terapia complementar.

1.3 EXPERIÊNCIA DO HOSPITAL A.C. CAMARGO

Entre janeiro de 1995 e dezembro de 2004, 49 pacientes com SPM de extremidades, não passíveis de ressecção adequada, de alto (79,6%) ou baixo grau (20,4%), e sem antecedente de RT ou QT prévias, foram tratados com radioquimioterapia neoadjuvante (AGUIAR JR et al. 2009). O esquema utilizado foi o mesmo preconizado pelo grupo da Universidade de Los Angeles, anteriormente descrito (ENGEL et al. 1993; EILBER et al. 1995), que consistiu em doxorubicina radiosensibilizante (dose total de 60mg/m² e RT na dose total de 30Gy). 43 pacientes foram submetidos à cirurgia após a terapia de indução. O índice de complicações severas relacionadas à ferida operatória foi de 41,8%. Na avaliação anatomopatológica das peças operatórias, observou-se necrose maior que 95% em 5 casos (11,6%), sendo 2 deles com resposta patológica completa (4,7%). As taxas de SLRL, SLRD e SG em 5 anos foram, respectivamente, 81,6%, 46,7% e 58,3%.

Apesar dos bons resultados em relação a taxas de controle local, as

altas taxas de complicações pós-operatórias relacionadas à ferida, com muitos pacientes evoluindo com recaída sistêmica e óbito, foram preocupantes, embora em concordância com os dados da literatura (PISTERS 1998; PISTERS 1999; O'SULLIVAN et al. 2002).

Tais achados motivaram o Grupo de Sarcomas do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C. Camargo a iniciarem, em 2005, um estudo prospectivo, ainda fase II, com uso de QT pré-operatória, sendo a RT aplicada de modo adjuvante, no intuito de diminuir as altas taxas de complicações de ferida operatória, decorrentes do uso da RT neoadjuvante, o que, muitas vezes, atrasava e até impossibilitava a realização de QT adjuvante, quando indicada, referente a experiência anterior (AGUIAR JR et al. 2009). Era imperativo avaliar se esse esquema de QT pré-operatória era capaz de diminuir as taxas de infecção de ferida cirúrgica, sem alterar as taxas de controle local e até de amputação. O Grupo se propôs a avaliar a ação da QT sistêmica e sua ação sobre o tumor, mensurando a resposta patológica, dada pela quantificação da necrose, fibrose e da percentagem de células viáveis nas peças cirúrgicas.

Usando esse mesmo princípio de tratamento, HENSHAW et al. (2001) mostraram excelente taxa de resposta anatomopatológica (>95% de necrose) para os pacientes tratados, com taxas de controle local comparáveis aos esquemas com RT. Quanto à resposta clínica, baseada em exames de imagem (Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética). Ainda nesse sentido, GORTZAK et al. (2001) mostraram em um ensaio clínico fase II, controlado, com 134 pacientes portadores de SPM de

alto risco, utilizando como esquema terapêutico a doxorrubicina e ifosfamida neoadjuvantes, taxas de resposta clínica objetiva de 29%, com 8% de resposta clínica completa.

Viu-se em muitos dos trabalhos, citados, que os critérios de seleção dos pacientes para a realização de QT foram baseados principalmente em grau histológico, tamanho e profundidade dos tumores. Tais critérios, apesar de muito usados, não se mostraram suficientes na identificação de quais pacientes realmente se beneficiariam da utilização de QT. Portanto, a identificação de marcadores moleculares, ou a avaliação de expressão proteica e de perfis de expressão gênica se fazem necessárias e devem ter seu papel bem-estabelecido. Do mesmo modo, a identificação de marcadores prognósticos, a partir de peças operatórias em pacientes submetidos a alguma terapia neoadjuvante, deve ser considerada.

1.4 MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS A PROGNÓSTICO E À RESPOSTA TERAPÊUTICA

Como se viu, o grau histológico de diferenciação celular é considerado um dos fatores prognósticos mais importantes em SPM, sendo também utilizado como fator preditivo de resposta às terapêuticas citotóxicas, prevendo-se melhores taxas de resposta para os pacientes com tumores de alto grau (CORMIER et al. 2004). Porém, não é incomum observar, na prática clínica, altas taxas de necrose induzida por RT ou QT em alguns tumores de baixo grau, assim como resultados frustrantes em

outros tumores de alto grau. Tal contradição nos leva a concluir que o valor preditivo do grau histológico como preditor de resposta à radio ou quimiossensibilidade, ainda, não está bem-estabelecido.

Em SPM, estudos que buscam a identificação de fatores moleculares ou bioquímicos, que se correlacionam com diagnóstico, prognóstico ou resposta a terapias locais e sistêmicas, vêm se tornando frequentes (MATSUMINE et al. 2007). A identificação de algumas translocações cromossômicas, que determinam a formação de genes de fusão associada à determinação de diferentes tipos histológicos, como em tumores da família Ewing (gene de fusão EWS-FL11) (ZUCMAN et al. 1992; GINSBERG et al. 1999), rabiomiossarcomas alveolares (genes de fusão PAX3-FKHR e PAX7-FKHR) (KELLY et al. 1997; SORENSEN et al. 2002) e sarcomas sinoviais (SYT-SSX) (LADANYI et al. 2002; GUILLOU et al. 2004), são alguns exemplos raros desses marcadores em sarcomas (OLIVEIRA e FLETCHER 2004; OTTAIANO et al. 2005).

Ratificando o exposto no parágrafo anterior, a identificação de marcadores moleculares prognósticos ou preditivos de resposta terapêutica, ainda, é mais rara. Destaca-se um estudo, em SPM, que avaliou, por imunohistoquímica (IQ), a expressão das proteínas HER2, ERCC1 e TOPO2A em 78 pacientes que foram submetidos à QT neoadjuvante baseada em doxorubicina. Foi um estudo retrospectivo para pacientes com tumores localmente avançados. Nesse estudo, a alta expressão da TOPO2A e ERCC1 foi relacionada com melhores taxas de SLRD (RODRIGO et al. 2011).

Ainda em sarcomas, outro estudo analisou o valor prognóstico e preditivo de resposta quanto à presença de alterações relacionadas ao p53 e p16/p14ARF em pacientes portadores de sarcomas de Ewing. A presença de deleções em p16/p14ARF ou alterações em p53, determinadas por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e IQ, respectivamente, correlacionaram-se significativamente com resposta pobre à QT neoadjuvante (HUANG et al. 2005).

A possibilidade de identificação de um perfil de expressão gênica associado à resposta ao tratamento, como, por exemplo, à QT, pode também ser empregada. Até o momento os resultados publicados são principalmente para osteossarcomas (OCHI et al. 2004; MINTZ et al. 2005; MAN et al. 2005). Para SPM há alguns trabalhos que tentam correlacionar perfil de expressão gênica e prognóstico (FRANCIS et al. 2007; HOFFMANN et al. 2009; STOCKWIN et al. 2009). Numa tentativa de correlacionar o perfil de expressão gênica em SPM de adultos com resposta à QT, AGUIAR JR (2007) indicou a via de sinalização mediada por TGF β como preditora de má resposta à QT neoadjuvante. Segundo o estudo, a via TGF β se encontrava significativamente alterada na comparação entre tumores respondedores e não respondedores à QT (Figura 1).

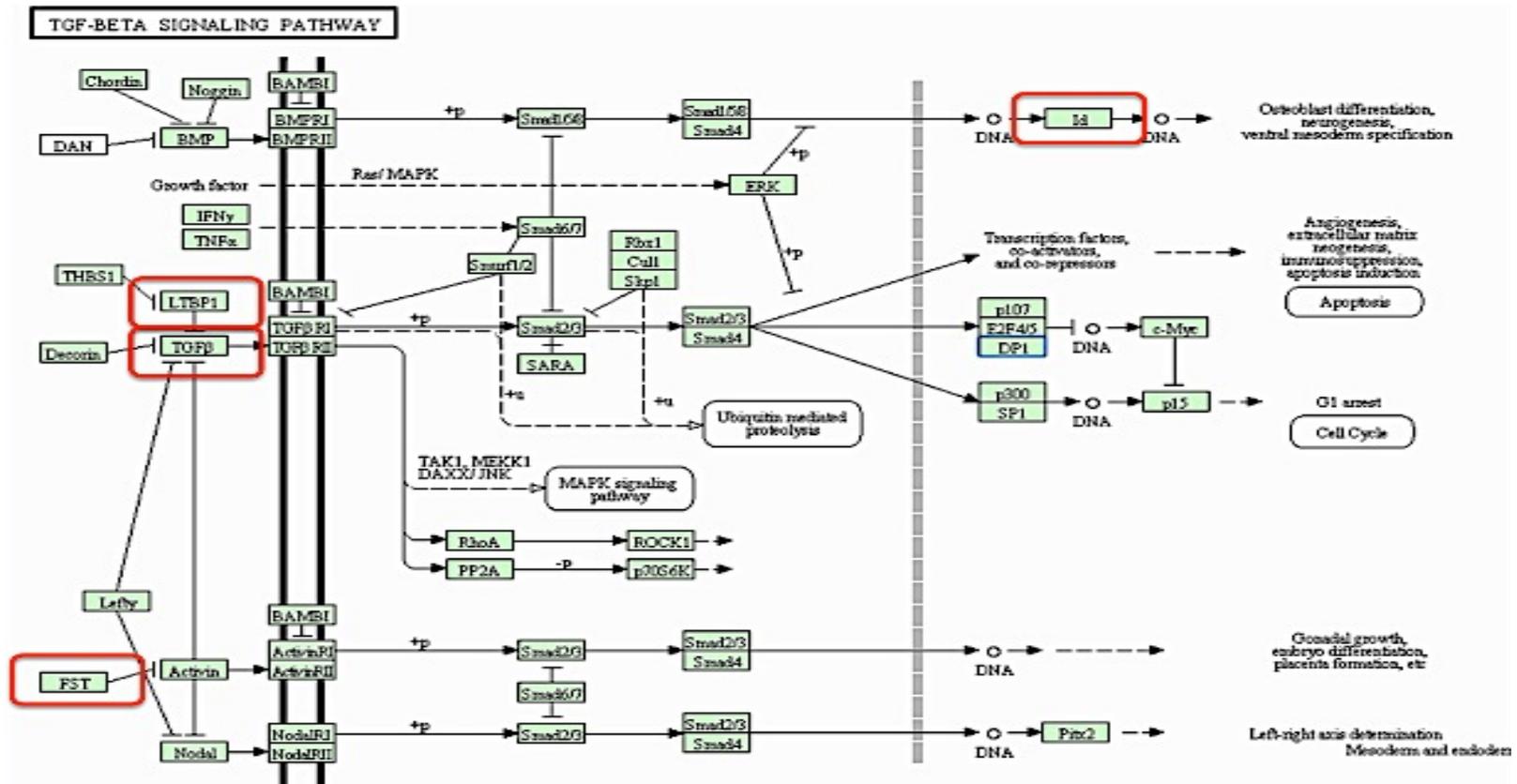
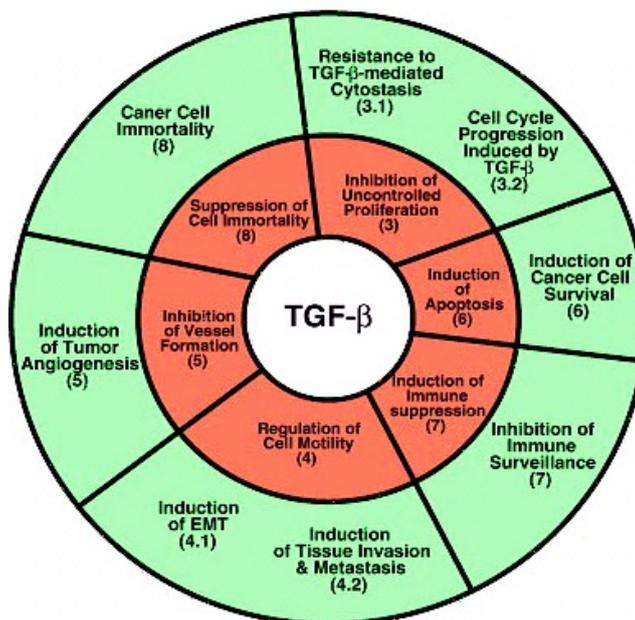


Figura 1 - Resultado da análise realizada a partir do aplicativo “Pathway express” a partir do banco de genes Kegg. Foram identificados marcadores que se encontraram diferentemente expressos, após realização de microarrays em pacientes portadores de SPM de extremidades, submetidos à QT neoadjuvante. Representação esquemática da via de sinalização regulada por TGFβ URL:<http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04350.html>, obtida após a disposição dos genes diferentemente expressos usados pelo programa para determinar qual via está alterada, através do aplicativo “pathway express” disponível no site <http://vortex.cs.wayne.edu/ontoexpress/>. Os círculos apontam para os genes que apresentaram diferença significativa de expressão entre os respondedores e os não respondedores.

1.5 VIA MEDIADA POR TGFB – MARCADORES TGFB, SMAD4, ID1 E FST

HANAHAN e WEINBERG (2000) propuseram que todas as neoplasias possuem traços “fisiológicos” principais durante o curso de malignização. A aquisição de autonomia no crescimento e multiplicação celular, resistência a sinais citostáticos e apoptóticos, e a indução da angiogênese com invasão e metástase representam pontos fundamentais que medeiam o desenvolvimento e a progressão tumoral. Muitos estudos mostram que a via mediada por TGF β tem papel principal, tanto direta como indiretamente, na regulação da aquisição, por células cancerígenas, de cada um destes traços citados anteriormente.

Transforming Growth factor- β (TGF β) é uma citocina multifuncional, produzida principalmente por macrófagos, que regula o desenvolvimento, diferenciação e homeostase. É considerado um potente agente antitumoral que inibe a proliferação descontrolada do endotélio e de células hematopoiéticas. Alterações na via mediada por TGF β criam mecanismo de resistência ao controle mediado pelo próprio TGF β , o que leva a fenômenos cancerígenos (BLOBE et al. 2000; SHI e MASSAGUÉ 2003; GALLIHER et al. 2006). Paradoxalmente existe uma série de eventos genéticos e epigenéticos que convertem o TGF β de um agente supressor para promotor do crescimento, desenvolvimento e metástase tumoral (Figura 2).



Fonte: TIAN et al. (2011).

Figura 2 - TGF β e sua ambiguidade na promoção ou supressão tumoral. Anel verde – Atuações do TGF β como promotor tumoral. Anel vermelho – Funções do TGF β como supressor tumoral.

Quando a habilidade citostática do TGF β é perdida, as células neoplásicas entram num ciclo celular contínuo, apesar da presença de qualquer citocina supressora (WAITE e ENG 2003). O TGF β também atua no fenômeno de "transição epitélio mesênquima", que, quando alterado, propicia a progressão tumoral e desenvolvimento de metástases. Além disso, altos níveis de TGF β circulantes inativam, paradoxalmente, sistemas de vigilância imune inatos, aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento e progressão de tumores (GORELIK e FLAVELL 2000).

O sistema de sinalização mediado por TGF β possui duas vias distintas principais: a via canônica e a via não canônica (Figura 3).

▪ Via Canônica

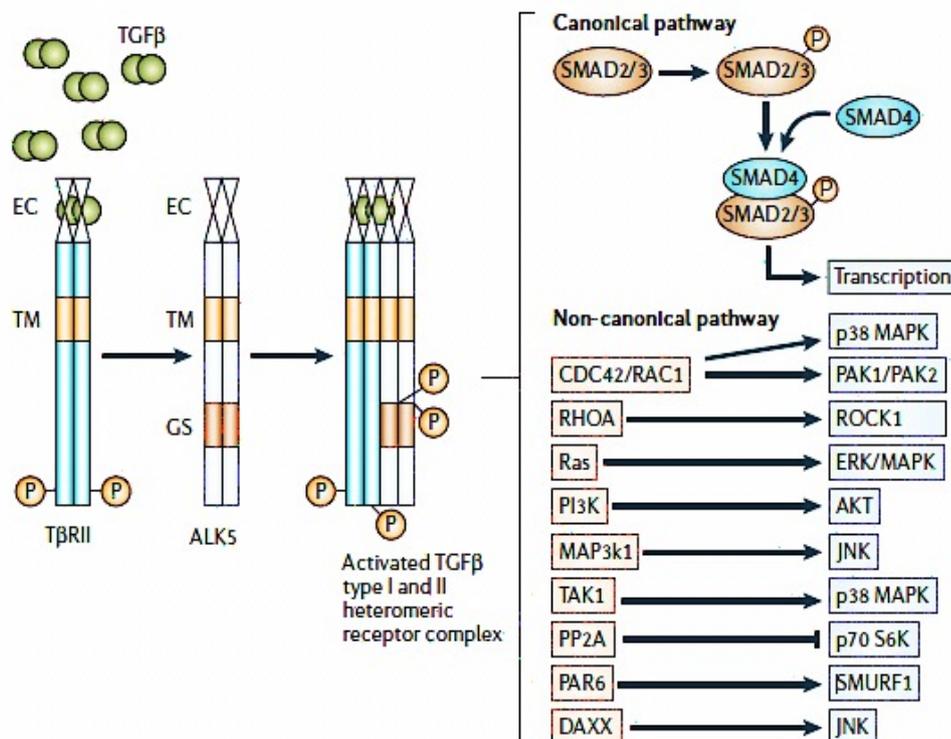
Os diversos efeitos do TGF β são mediados por um sistema simples de sinalização formado por três receptores de membrana: T β R-I, T β R-II e T β R-III; e três fatores de transcrição latentes intracelulares: SMAD 2, 3 e 4 (MOUSTAKAS e HELDIN 2005; FENG e DERYNCK 2005; TIAN et al. 2011). Uma das isoformas do TGF β (I, II ou III) se liga ao T β R-II que forma um complexo transmembrana com T β R-I. Este último, ativado, estimula na porção intracelular, os fatores transcricionais SMAD2 e SMAD3 latentes, através de uma reação de fosforilação nas suas porções C-terminais. Essa fosforilação facilita a associação dos SMADs 2 e 3 com o SMAD4. Posteriormente, esse complexo heterodimérico SMAD2, 3/4 migra e se acumula no núcleo.

O acesso ao núcleo viabiliza ao complexo SMAD2, 3/4 à interação com uma grande variedade de co-ativadores e supressores transcricionais que alteram a função da célula, através da indução ou supressão celular, coordenada por genes responsivos ao TGF β (MOUSTAKAS e HELDIN 2005). A reação de fosfotransferase de ativação dos SMADs, no citoplasma, pode ser inibida pelo SMAD inibidor (SMAD7), através de duas maneiras principais: inibição direta sobre o T β R-I ocluindo o acesso aos SMADs 2 e 3 (HAYASHI et al. 1997; NAKAO et al. 1997; SOUCHELNITSKYI et al. 1998); e recrutando a E3 ligase SMURF1/2, facilitando a ubiquitinação e degradação do receptor de TGF β no proteossoma (KAVSAK et al. 2000; EBISAWA et al. 2001).

- **Via Não Canônica**

O TGF β também altera o comportamento celular através da ativação dos SMADs 2 e 3 por uma via independente de sinalização, não canônica. Esta via surge a partir da habilidade do TGF β em estimular MAP quinases (ERK1/ERK2, p38-MAPK e JNK), quinases associados ao crescimento e sobrevivência (PI3K, AKT/PKB, e mTOR) e um pequeno grupo de ligantes GTPs: Ras, RhoA, Rac1, e Cdc42 (BHOWMICK et al. 2001; BAKIN et al. 2002; LAMOUILLE e DERYNCK 2007). Adicionalmente, a ativação do sistema de sinalização NF- κ B tipicamente é reprimida por TGF β em epitélios normais (AZUMA et al. 1999). A ativação de modo amplificado dos componentes dessa via não canônica de sinalização tem sido responsabilizada por sobrepujar os mecanismos normais de homeostase celular governados pelos SMADs 2 e 3, exercendo um papel proeminente no desenvolvimento das neoplasias. Permanece incerto, como os dímeros de TGF β agem na ativação dos efetores da via não canônica de sinalização, assim como a maneira pela qual as atividades deles, se tornam desregulados em resposta ao próprio TGF β no desenvolvimento e progressão dos tumores (TIAN et al. 2001).

Os efeitos do TGF β em sarcomas são raramente reportados. WANG et al. (2003) observaram que a transdução de sinal via SMAD é importante na regulação do crescimento do rabdomyosarcoma embrionário. Tecidos de rabdomyosarcoma mostraram, em uma análise mais recente, uma alta expressão de ERK2 e SMAD4, quando comparados ao controle normal (WANG et al. 2007).



Fonte: BIERIE e MOSES (2006).

Figura 3 - Visão geral da via de sinalização mediada por TGF β no câncer. T β R-I também é conhecido como *activin-like kinase 5* (ALK5). A via canônica representada pela fosforilação dos SMADs 2 e 3 e migração do complexo com o SMAD 4 ao núcleo. A via não canônica e seus fatores de transcrição envolvidos, alguns exemplos são: EMT (*epithelial–mesenchymal transition*), PAK (*p21-activated kinase*), PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) SMURF1 (*Smad ubiquitination regulatory factor 1*).

O SMAD4 ou co-SMAD é um fator de transcrição pertencente à superfamília do TGF β , que forma um complexo heterotípico com os SMAD2 e 3 fosforilados e migram para o núcleo da célula. O SMAD4 exerce um papel fundamental na via mediada por TGF β , mantendo a homeostase celular e tecidual, atuando como supressor tumoral. A perda de expressão do SMAD4 é encontrada em carcinomas espinocelulares (CEC) de pele e de esôfago (YANG e YANG 2010). Em outros tumores, como, por exemplo, adenocarcinoma de pâncreas ou colangiocarcinomas, a deficiência de SMAD4 não estimula a carcinogênese, mas atua como promotor tumoral,

acelerando sinergicamente o desenvolvimento e progressão da neoplasia que foi iniciada através de outras vias oncogênicas (YANG e YANG 2010). A via de sinalização canônica, descrita anteriormente, compreende a via da qual o SMAD4 faz parte. A via não canônica é tida como SMAD independente.

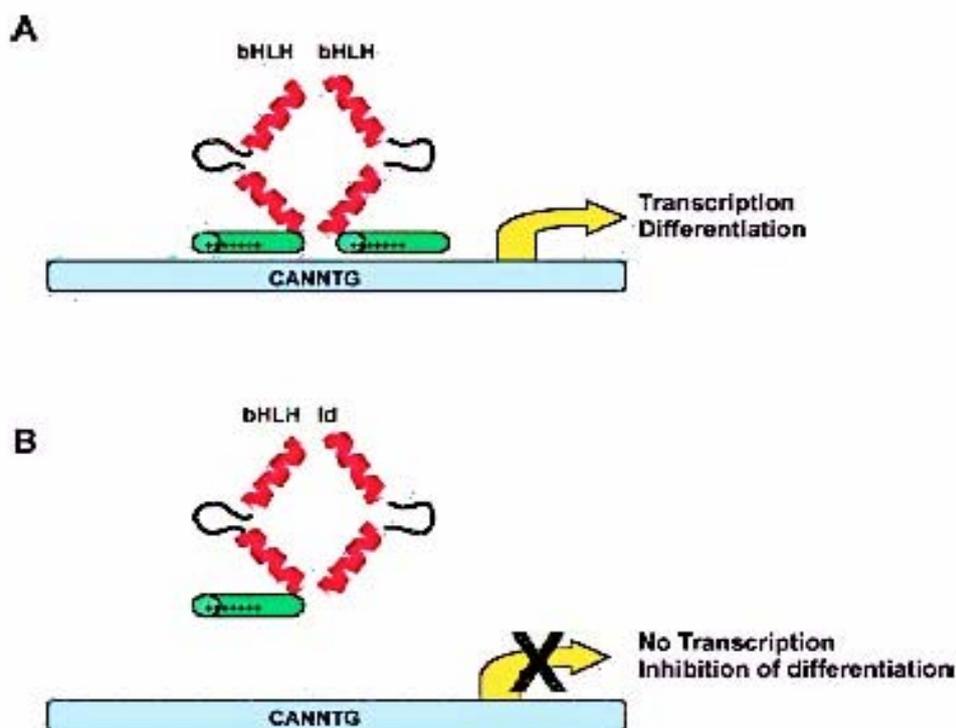
A Folistatina (FST) é uma glicoproteína secretada na glândula pituitária e gônadas. Tem como função fisiológica suprimir a síntese e secreção do FSH (hormônio folículo estimulante) da pituitária, sendo anteriormente denominada de *FSH-suppressing protein* (FSP) (RODINO-KLAPAC et al. 2009). Distribuída por muitos órgãos, a FST é encontrada, na maioria das vezes, na circulação após ser secretada pelas próprias paredes das veias do corpo. Três isoformas de FST são produzidas: FS288, FS303, e FS315. A forma curta, FS288, se liga intrinsecamente ao heparan-sulfato de proteoglicanos, sendo normalmente encontradas na superfície celular, podendo ser lançadas na circulação pela heparina (NAKAMURA et al. 1991; PHILLIPS et al. 2000). Em contraste, a forma longa, FS315, é a principal encontrada na circulação. Tem como funções mediar o crescimento celular, desenvolvimento e diferenciação de vários órgãos e tecidos (DE KRETZER et al. 2012). Essas proteínas bloqueiam a interação entre as ativinas e seus receptores de superfície. As ativinas são membros da superfamília do TGF β , que incluem as próprias ativinas, inibinas, *TGF β s*, *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *growth and differentiation factor* (GDF), Nod, miostatina, *lymphocyte inhibitory factor* (LIF), entre outros. Os efeitos biológicos dos membros dessa superfamília ocorrem em vários tipos celulares. Elas

regulam a proliferação celular, apoptose e carcinogênese de um modo mediado, principalmente, via SMAD (PHILLIPS et al. 2000). Receptores celulares das ativinas, quando ativados, geram uma cascata de fosforilação até os SMADs 2 e 3 da via canônica do TGF β que seguem o fluxo normal até o núcleo quando unidos, no complexo heteromérico, ao SMAD4 (LI et al. 2011).

Inhibitors of differentiation or inhibitors of DNA binding (Ids) são proteínas que regulam negativamente fatores de transcrição nuclear. São induzidas pelas *bone morphogenetic proteins* (BMPs), que são membros da superfamília TGF β , presentes em muitos tipos celulares. As proteínas Id são um dos alvos principais dos BMPs, sendo responsáveis por muitas atividades biológicas destas proteínas (MIYAZONO e MIYAZAWA 2002).

Quatro subtipos de Id foram encontradas em mamíferos: Id1 a Id4. Geralmente, elas agem como reguladoras positivas da proliferação celular e negativas na diferenciação celular. Durante o desenvolvimento embrionário o balanço entre a proliferação e diferenciação celular deve ser coordenado. As proteínas Id estão envolvidas nessa coordenação (LYDEN et al. 1999) com provável controle no tempo de mudança entre a proliferação e diferenciação celular. Fisiologicamente, elas interagem com fatores de transcrição bHLH através das regiões HLH das proteínas que se ligam ao DNA. Eles são tidos como fatores inibidores da diferenciação celular, porque muitos dos fatores de transcrição bHLH regulam positivamente a diferenciação celular em vários tecidos e células do corpo (Figura 4). Estão envolvidas também em processos apoptóticos e de angiogênese (SIKDER et

al. 2003). Por exemplo, proteínas Id1 em mioblastos associam-se com proteínas E2A e inibem a formação de um heterodímero funcional chamado E2A-MyoD, que mantém um fenótipo desdiferenciado nos mioblastos. Os BMPs também induzem à expressão de Id1 nas células endoteliais. Esse achado sugere um importante papel do Id no desenvolvimento e homeostase vascular tecidual. O Id2 age positivamente na regulação do ciclo celular. Ela interage com a forma hipofosforilada ativa de proteínas da família Rb (retinoblastoma) e inibe as funções antiproliferativa delas (MIYAZONO e MIYAZAWA 2002).



Fonte: SIKDER et al. (2003).

Figura 4 - Modelo esquemático mostrando os efeitos do Id na transcrição mediada por bHLH. A: Ativação da transcrição pelos dímeros de bHLH na ausência de Ids culminando em diferenciação celular. B: Com a expressão das proteínas Id, os dímeros de bHLH-Id formados são incapazes de ligarem-se ao DNA, promovendo a inibição dos genes associados à diferenciação celular.

Diante do fato de que programas de diferenciação celular são frequentemente alterados durante o desenvolvimento de neoplasias, não é surpresa que as proteínas Id tenham papel nesse processo. Essa hipótese também foi levantada ao se observar em altos níveis de expressão de Id em células na fase proliferativa e indiferenciadas (ISRAEL et al. 1999). Além disso, em cultura de células tumorais foram observadas, nas linhagens celulares bem diferenciadas – ceratinócitos, mioblastos, epitélio mamário e células pré-adipócitas uma baixa expressão das proteínas Id. De modo adverso, a superexpressão dessas proteínas conseguiu inibir a diferenciação dessas células mesmo que em condições apropriadas (LASORELLA et al. 2001). A expressão gênica dos Id tem sido mostrada em vários tipos de tumores, incluindo câncer de pulmão, sarcoma de Ewing e condrossarcomas (LASORELLA et al. 2001).

Diante do exposto, apesar de ser pequeno o número de casos onde foram encontradas a superexpressão dos genes descritos anteriormente, ficou clara a participação deles em processos vitais de desenvolvimento celular, maturação e diferenciação.

2 JUSTIFICATIVA

A identificação de um perfil de expressão gênica que indicou como superexpressa a via de sinalização mediada por TGF β , em pacientes adultos portadores de SPM de extremidades, não respondedores à QT pré-operatória, mostrada anteriormente no nosso serviço (AGUIAR JR 2007) associado ao tamanho pequeno da amostra analisada, nos estimulou a realização deste estudo no intuito de aumentar o número de pacientes a serem avaliados com ênfase nos resultados clínicos e, principalmente, na avaliação quanto à expressão proteica dos produtos dos genes *Transforming Growth factor- β* (TGF β); *Follistatin* (FST); *Id1* (*inhibition of differentiation 1*); e SMAD4 da via mediada por TGF β , e a correlação destes com a resposta patológica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar por imunistoquímica a expressão proteica de TGF β , FST, Id1 e SMAD4 – todos pertencentes a via mediada por TGF β – correlacionando os resultados à resposta patológica em pacientes portadores de SPM de extremidades de alto grau, não passíveis de ressecção adequada, submetidos a tratamento pré-operatório com ifosfamida e doxorrubicina.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- 1 Expandir os resultados preliminares de um ensaio clínico fase II que usa o esquema de QT pré-operatória com doxorrubicina e ifosfamida, associado a RT adjuvante, utilizando como desfechos a taxa de resposta objetiva sobre o tumor primário; a taxa de preservação de membros e a taxa de contra-indicação cirúrgica causada por complicações do tratamento ou por progressão de doença durante o tratamento pré-operatório.
- 2 Determinar as taxas de toxicidade do esquema proposto.
- 3 Avaliar o método de análise patológica que quantifica a percentagem de células tumorais viáveis nas peças operatórias ressecadas, dos pacientes arrolados no estudo, que vem sido utilizado no Hospital A.C.Camargo e correlacionando com dados de sobrevida.

4 MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional transversal, com os pacientes provenientes de um estudo clínico prospectivo, não controlado de fase II, em andamento no Hospital A.C.Camargo desde janeiro de 2005, que investiga a efetividade do esquema de tratamento pré-operatório com doxorubicina e ifosfamida em adultos portadores de SPM de extremidades, não passíveis de ressecção adequada, o que totalizou 42 pacientes. O término de recrutamento se deu em junho de 2011 com os dados de seguimento analisados até 30 de outubro de 2012. Os critérios de inclusão e exclusão são:

4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com idade acima de 16 anos, portadores de SPM de alto grau histológico de extremidades, incluindo cintura pélvica e escapular, confirmado por exame anatomopatológico;
- Pacientes portadores de tumores primários ou recidivados, não passíveis de ressecção com margem tridimensional de 2,0 cm adequada, ou nos quais não seja possível a preservação do membro, ante o julgamento clínico realizado pelo cirurgião, em pacientes que não tenham sido submetidos à QT ou à RT prévia;
- Índice de Karnofsky maior que 70%;

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

4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- a Pacientes com diagnóstico de: rabdomiossarcoma embrionário; tumores neuroectodérmicos primitivos (PNET's); condrossarcomas ou osteossarcomas;
- b Pacientes que tenham sido submetidos à RT ou à QT como tratamento prévio;
- c Portadores de infecção por HIV;
- d Recusa em assinar Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital A.C. Camargo (Anexo 5)

4.3 VARIÁVEIS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS COLETADAS

Os dados clínicos e de anatomia patológica foram coletados em ficha padronizada (Anexos 1 e 2). Algumas observações são feitas a seguir.

O Anexo 1 se refere apenas à biópsia, a IQ descrita é diagnóstica.

- Topografia da lesão, incluem-se: membro inferior (localização distal à prega inguinal); membro superior, definido como localização distal ao ombro; cintura pélvica, que inclui tumores da região glútea ou inguinal, excluindo-se os tumores da fossa ilíaca; e cintura escapular, compreendendo o ombro, axila ou região escapular.
- Manipulação prévia considera-se para análise em um só grupo os pacientes intactos ou que tenham sido submetidos apenas a biópsia incisional ou por agulha grossa; considerou-se ressecção recente àqueles pacientes que foram submetidos à cirurgia em até três meses antes da admissão no nosso serviço; enquanto tumor recidivado foi tido como aquele que surgiu após três meses de um eventual tratamento cirúrgico prévio.
- Utilizou-se o índice de Karnofsky para a determinação da performance status.
- Para o item Toxicidade, classificaram-se o tipo e a graduação das complicações, com base nos Critérios Comuns de Toxicidade padronizados pelo *National Institute of Health* (NIH) 2.0, já inseridos na ficha do Anexo 2 e disponível no site <http://safetyprofiler-ctep.nci.nih.gov/CTC/CTC.aspx>.

4.4 FINANCIAMENTO E APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O presente estudo foi financiado pelo programa CEPID, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Faz parte do programa proposto pela Capes em conjunto com a FAP – Fundação Antônio Prudente, denominado “Residência-Doutorado”.

Todos os pacientes que participaram deste trabalho assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 5) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C.Camargo (Anexo 6).

4.5 COLETA DE MATERIAL PARA ARMAZENAMENTO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Todos os pacientes foram submetidos à biópsia (incisional ou por agulha grossa guiada por TC ou ultrassonografia - US) para confirmação histopatológica, determinação do grau de malignidade histológica e coleta de material para análise molecular posterior. O material que foi enviado para diagnóstico anatomopatológico foi coletado em formalina tamponada e incluído em parafina pelo processo tradicional. Parte do tecido tumoral coletado foi imediatamente identificado e congelado em nitrogênio líquido ou imerso em solução RNA Later® (Ambion, Austin, TX, EUA) sendo armazenado em até 24 horas à temperatura de -80°C .

Foram utilizadas as lâminas coradas por hematoxilina e eosina (H&E), presentes no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C.Camargo, para a confirmação diagnóstica, obtenção de variáveis histológicas e realização de IQ (Protocolo Anexo 3). Todos os casos foram revisados por uma única patologista do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C.Camargo (IWC), com o diagnóstico e a graduação dos tumores, seguindo a orientação da Organização Mundial de Saúde publicada na série “Blue Books” (*Pathology & Genetics – WHO classification of tumors e Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer – FNCLCC*) (GUILLOU et al. 1997; FLETCHER et al. 2002). Considerou-se para este trabalhos, os tumores de graus 2 e 3 como de alto grau. O prontuário dos pacientes foi avaliado para a coleta de dados clínicos e de exames complementares.

A partir de cada peça cirúrgica ressecada após o tratamento pré-operatório com QT, foi obtida e representada uma fatia inteira do espécime em que havia menor necrose macroscópica visível. Uma fotocópia desta fatia foi feita e mapeada com realização de cortes de 1,0 a 2,0 cm². Em seguida, foram confeccionados os blocos e lâminas para estudo microscópico (Figura 5).

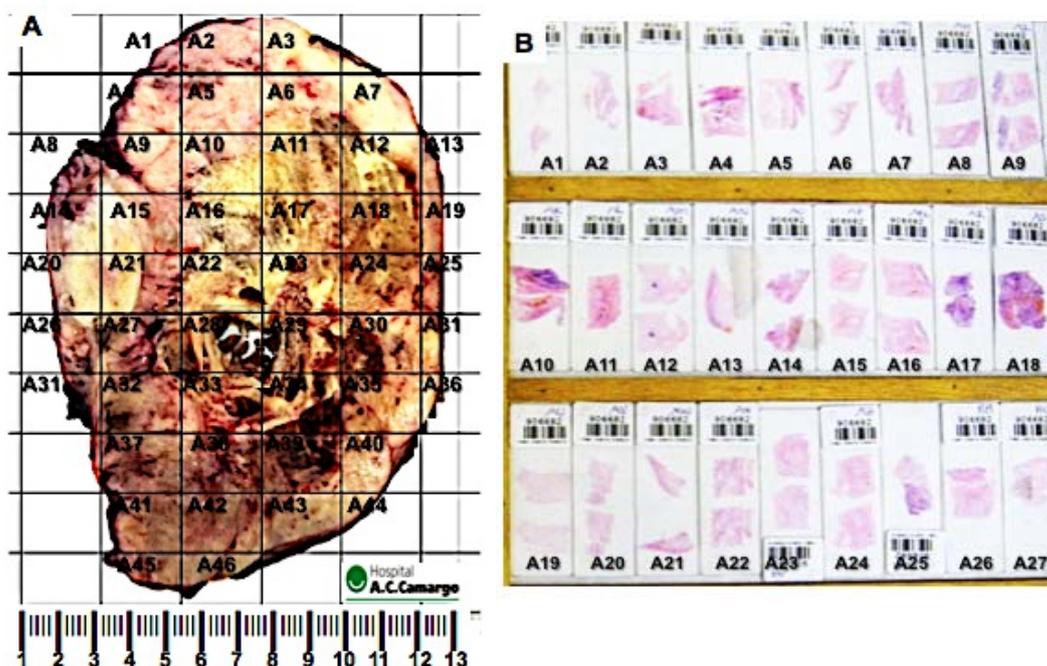


Figura 5 - Fotografia colorida do fragmento central de uma peça operatória e lâminas de microscopia. (A) Fragmento central de peça operatória: As demarcações e dígitos grafados são exemplos de como é realizado o mapeamento do fragmento estudado. As demarcações seguem um padrão de 1-2cm² de diâmetro com uma sequência de letras e números. (B) Lâminas de microscopia confeccionadas a partir de áreas previamente demarcadas e correspondentes às mostradas em (A).

Ao exame microscópico, foi estabelecida a percentagem de células viáveis, fibrose e necrose em cada lâmina. Ao final, a soma das porcentagens de células viáveis em cada lâmina foi dividida pelo número de lâminas avaliadas. Com esse cálculo obteve-se o valor médio, em percentagem, de células viáveis presentes no espécime cirúrgico.

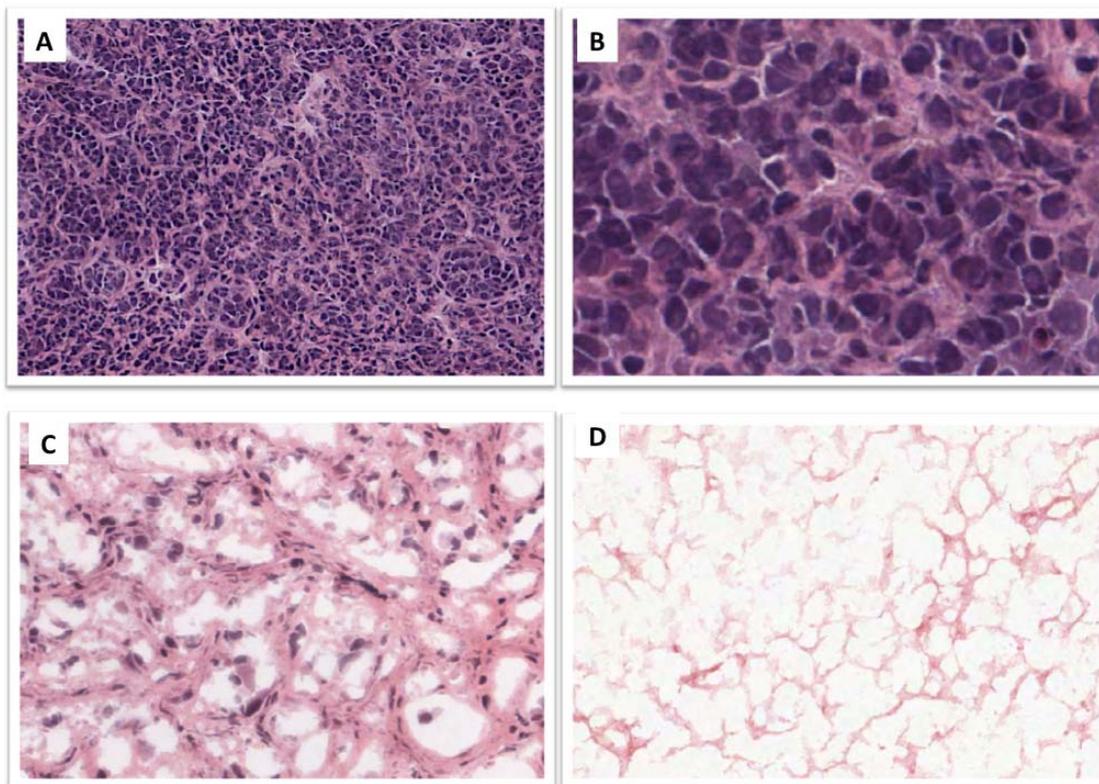


Figura 6 - Fotomicrografia de sarcoma sinovial representando fragmento de peça operatória dos pacientes submetidos QT pré-operatória. A – 100% de células viáveis (10X), B – 100% de células viáveis (40X). C – Área correspondente a necrose (10X) e D – ausência de células viáveis (10X).

4.6 ESTADIAMENTO DOS TUMORES

Como método de estadiamento local utilizou-se a tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM). Para a avaliação quanto à presença de doença à distância, foi utilizada a TC de tórax. Para os portadores de lipossarcoma de extremidades, foi realizada TC ou ultrassonografia (US) de abdômen total e pelve para investigar se havia a presença de lesão sincrônica retroperitoneal. Todos os tumores, inclusive os recidivados, foram reclassificados de acordo com o AJCC 7^a edição (EDGE et al. 2010).

4.7 QUIMIOTERAPIA E AVALIAÇÃO DE RESPOSTA CLÍNICA

O tratamento realizado obedeceu a um padrão adotado no Hospital A.C.Camargo desde 2005. O plano terapêutico foi de um ciclo a cada 21 dias, completando um total de quatro ciclos, discriminado, a seguir:

- Doxorrubicina: 30 mg/m² por via endovenosa, em “bolus”, D1 e D2.
Dose total de 60 mg/m²;
- Ifosfamida: 2,0 g/m²/dia por via endovenosa em 1 hora, D1 a D5.
Dose total de 10 g/m²;
- MESNA: 100% da dose de ifosfamida, 15 minutos antes e 4 horas e 8 horas após o início da infusão de ifosfamida.

Após a fase de QT de indução, os pacientes foram avaliados quanto à resposta clínica. Eles foram examinados após três semanas de cada ciclo de QT pelo cirurgião responsável. Exames de imagem, TC ou RM do local do tumor e TC do tórax, foram realizados antes do início do tratamento, durante a fase de estadiamento, e três semanas após o término do último ciclo de QT. Os critérios usados para avaliação de resposta clínica foram os preconizados pelo RECIST (THERASSE et al. 2000).

A partir da análise unidimensional do maior diâmetro tumoral em milímetros, foram comparadas as imagens pré e pós-tratamento. Após isso feito, os resultados foram classificados em:

a) Resposta Parcial - quando houve diminuição maior ou igual a 30% do tamanho do maior diâmetro do tumor em comparação com a imagem pré-tratamento;

b) Resposta Completa - quando não houve evidência de tumor; e

c) Doença Estável (ou sem resposta) - quando a diminuição no tamanho do maior diâmetro do tumor foi menor que 30% ou quando houve aumento menor que 20%. Considerou-se como:

d) Progressão de Doença quando se observou aumento maior que 20% no maior diâmetro do tumor primário, ou surgimento de metástases à distância (Figura 7).

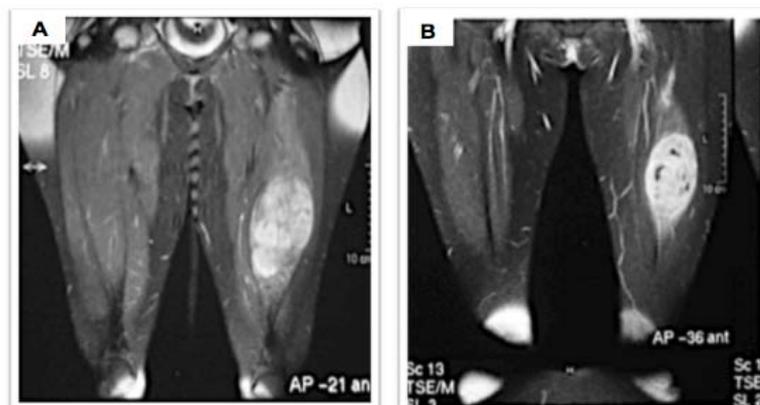


Figura 7 - Avaliação de resposta clínica (RECIST). As letras A e B mostram um caso em que houve resposta parcial após o tratamento pré-operatório. (A) corte sagital de RM de membros inferiores mostrando lesão na coxa esquerda antes da realização da QT pré-operatória. (B) corte sagital de RM de membros inferiores após a realização de 4 ciclos de QT, mostrando redução de 30% da lesão, no maior diâmetro.

A cirurgia ocorreu dentro de um período de 3 a 4 semanas após o término do último ciclo de QT. Todos os pacientes foram avaliados para a ressecção oncológica com preservação de membros. Os pacientes, cujas lesões não apresentaram resposta a ponto de permitir a preservação do

membro, foram indicados para um novo esquema neoadjuvante, com RT, ou operados precocemente (Figura 8). A indicação de amputação ou desarticulação foi considerada após ausência de resposta clínica suficiente para permitir a cirurgia conservadora do membro, mesmo após a mudança do esquema terapêutico pré-operatório.

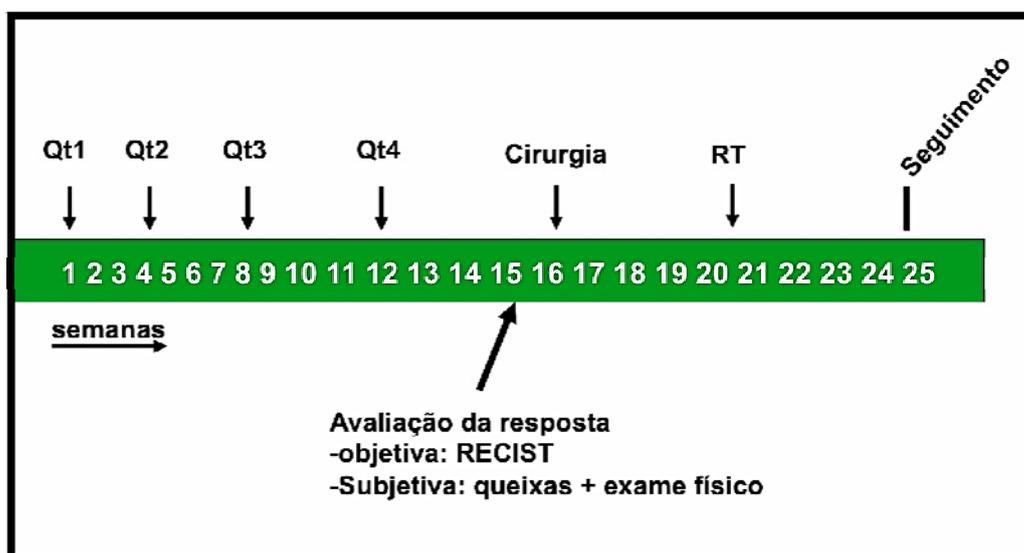


Figura 8 - Representação esquemática do protocolo de tratamento para SPM de alto grau em extremidades não passíveis de ressecção adequada adotado no hospital A.C. Camargo. São preconizados 4 ciclos de QT (Qt1-4) como doxorubicina e ifosfamida até a 12^a semana. Na 15^a semana são realizados exames de imagem (CT ou RM) para avaliação da resposta clínica (RECIST). Os pacientes são submetidos à cirurgia em seguida. A RT adjuvante foi realizada cerca de 4-8 semanas após a cirurgia.

Embora existam muitas variações quanto aos tipos de cirurgia, obedeceu-se ao princípio da ressecção tridimensional, com ressecção em bloco do tumor, contendo tecido normal no seu contorno, nos sentidos longitudinal, transversal e em profundidade com margem de 2cm. Nos casos de tumor residual macroscópico, identificado após a remoção da peça, sendo o paciente submetido à cirurgia preservadora, a ressecção foi

classificada como inadequada. Portanto, a classificação das operações foi feita pelo cirurgião ao final dos procedimentos, sem conhecimento da determinação microscópica das margens, ou seja, sem, necessariamente, a realização de exame de congelação, em adequada, marginal ou inadequada.

A peça operatória foi estudada pelo patologista que classificou as margens de ressecção de maneira convencional, classificando, em três categorias: (i) margens livres (ressecção R0); (ii) margens microscopicamente comprometidas (ressecção R1); (iii) e margens macroscopicamente comprometidas (ressecção R2). As margens livres foram subdividas em: amplas e exíguas, esta última foi assim chamada quando a margem livre foi de ≤ 2 mm em relação ao tumor.

4.8 RADIOTERAPIA PÓS-OPERATÓRIA

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

Todos os pacientes foram candidatos à RT pós-operatória, que se iniciou dentro de no máximo 60 dias após a cirurgia, conforme o seguinte protocolo:

1. Teleterapia: Dose total de até 65 Gy, com reduções prevista para 45 e 55 Gy, com fracionamento de 180 cGy/dia, 5 vezes por semana (35 sessões).

2. Planejamento:

- *Clinical Target Volume*₁ (CTV₁): Leito tumoral + 5 cm no sentido longitudinal e 2 cm lateralmente. Para lesões pélvicas ou de cintura escapular, margens de 2 a 3 cm poderiam ser consideradas;
- CTV₂: leito tumoral + 2 cm;
- *Planning Target Volume*₁ (PTV₁): CTV₁ + 1 cm. Dose para PTV₁: 4.500 cGy/25 frações;
- PTV₂: CTV₂ + 1 cm. Dose para PTV₂ : 2.000 cGy/10 frações.

4.9 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DE IMUNOISTOQUÍMICA

Avaliou-se a correlação entre o ganho ou perda de expressão das proteínas TGF β , FST, Id1 e SMAD4 nas amostras de biópsias e peças operatórias dos pacientes tratados com QT pré-operatória, correlacionando com a resposta patológica avaliada através da contagem de percentagem de células viáveis presentes nos espécimes cirúrgicos. Os pontos de corte adotados foram $\leq 5\%$, $\leq 10\%$ e $\leq 30\%$ de células viáveis.

As reações de imunistoquímica (IQ) foram feitas usando o sistema de detecção *Envision FLEX/HRP*-polímero (DAKO) (Anexo 3). Dados referentes aos anticorpos utilizados, diluição e fabricantes estão listados na Tabela 1; maiores detalhes no Anexo 4.

A extensão da positividade foi estabelecida de duas maneiras distintas: uma para as marcações nucleares e outra para as citoplasmáticas.

Para as marcações nucleares graduou-se numa escala de 0 a 3 a depender da percentagem de células com positividade dos núcleos presentes no campo de grande aumento (SMAD4 e Id1), sendo: **0**, com valores entre 0% a 25% das células positivas; **1**, mais de 25% e até 50%; **2**, mais de 50% e até 75%; e **3**, quando a positividade estivesse presente em mais de 75% das células.

Para as marcações citoplasmáticas (TGF β e FST) graduou-se numa escala de 0 a 3+ a depender da intensidade de marcação no campo de grande aumento: **0** representa a não expressão da proteína, **+** pouca intensidade, **++** moderada intensidade e **+++** forte intensidade (exemplos das marcações para cada Ac estudado estão mostrados nos resultados deste trabalho). Para fins estatísticos, 0 e 1 foram agrupados em relação a 2 e 3.

Tabela 1 - Descrição dos anticorpos primários utilizados, diluições, fabricantes e clones utilizados nas reações de imunistoquímica

ANTICORPO	MARCA	CLONE	DILUIÇÃO
FST (citoplasma)	Sigma-Aldrich	Policlonal	1:50
SMAD 4 (nuclear)	Novus Biologicals	IMD-89	1:80
TGF β (citoplasma)	Novo Castra	TGFB17	1:100
ID1 (nuclear)	Abcam	2456C1a	1:100

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o *software Package for the Social Sciences for Windows*TM versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). As variáveis e desfechos clínicos do estudo foram descritivas e se deram

através de determinação das frequências simples das próprias variáveis e dos desfechos. Foram usados os testes de McNemar para variáveis categóricas pareadas e Qui-quadrado (X^2) ou Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas não pareadas. As medidas de tendência central (média e mediana) e de variabilidade (variância e desvio padrão) foram utilizadas para descrever as variáveis numéricas; e a distribuição de frequência foi utilizada para as variáveis categóricas. O tempo médio e mediano de seguimento foi calculado a partir da data da realização do primeiro ciclo da quimioterapia até a data da última consulta, da perda de seguimento ou do óbito. Consideramos como significativo $p < 0,05$. Cálculos de sobrevida e a confecção da curva de sobrevida foram realizados pelo método de Kaplan-Meier (Mantel-Cox) e teste de Log-Rank. Para a análise dos fatores prognósticos de SLRD, excluíram-se os casos de pacientes com doença metastática no momento da cirurgia e os casos que não foram operados, tendo, desse modo, apenas os pacientes que foram tratados com intenção curativa.

5 RESULTADOS

5.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS E REFERENTES AO TUMOR

De abril de 2005 a junho de 2011, 42 pacientes portadores de SPM de alto grau, não passíveis de ressecção adequada, localizados em extremidades, incluindo cintura pélvica e escapular, foram elegíveis para o protocolo de terapia pré-operatória com doxorubicina e ifosfamida no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C.Camargo, em São Paulo. As variáveis clínicas foram atualizadas até 30 de outubro de 2012 e estão mostradas na Tabela 2.

A mediana de idade dos pacientes foi de 44 anos (16-84): 22 pacientes (52,4%) eram homens e 20 (47,6%) eram mulheres. O tamanho das lesões, no maior eixo, variou de 40mm a 350mm, e a média de 120mm (*dp* 71,56mm); 19 pacientes (45,3%) tinham tumores menores ou iguais a 100mm, enquanto 23 (54,7%) tinham tumores com tamanho maior que 100mm. Dentre uma grande variedade em relação ao tipo histológico, o mais comum foi o sarcoma sinovial seguido do tipo fusocelular e mixofibrossarcoma, com 26,2%, 19,1% e 16,7% das amostras, respectivamente (Tabela 2). Todos os casos foram de sarcomas de alto grau. Três pacientes foram classificados como estágio clínico IIb; outros trinta (71,4%) como III; e dos demais 9 pacientes (21,4%) tinham doença metastática ao diagnóstico (EC IV). A maioria dos pacientes (71,4%) tinha

tumores localizados em membro inferior e intactos ou, apenas, biopsiados quando na entrada no estudo.

Tabela 2 - Frequência das variáveis clínicas e relativas ao tumor (n=42).

Variável	Categoria	n* (%)
Gênero	Masculino	22 (52,4)
	Feminino	20 (47,6)
Idade (anos)	<40	16 (30,7)
	40 ou mais	26 (69,3)
KPS** (%)	<70	4 (9,5)
	80 ou mais	38 (90,5)
EC	II _b	3 (7,2)
	III	30 (71,4)
	IV	9 (21,4)
Comorbidade	Sim	15 (35,7)
	Não	27(62,8)
Tamanho (cm)	≤10	19 (45,3)
	>10	23 (54,7)
Tipo histológico	Sinovial	11 (26,2)
	Fusocelular	8 (19,0)
	Mixofibrossarcoma	7 (16,7)
	Pleomórfico	6 (14,4)
	Leiomiossaroma	6 (14,4)
	Lipossarcoma	3 (7,2)
	Epitelióide	1 (2,1)
Topografia	Membro inferior	30 (71,4)
	Membro superior	5 (11,9)
	Cintura pélvica	4 (9,5)
	Cintura escapular	3 (7,2)
Recidivado	Sim	5 (11,9)
	Não	37 (88,1)

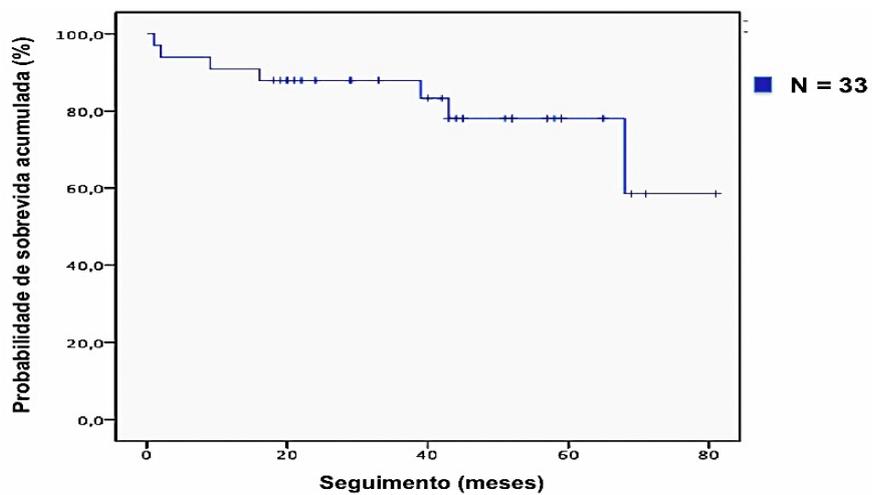
*n = Número de casos;

**KPS = Karnofsky.

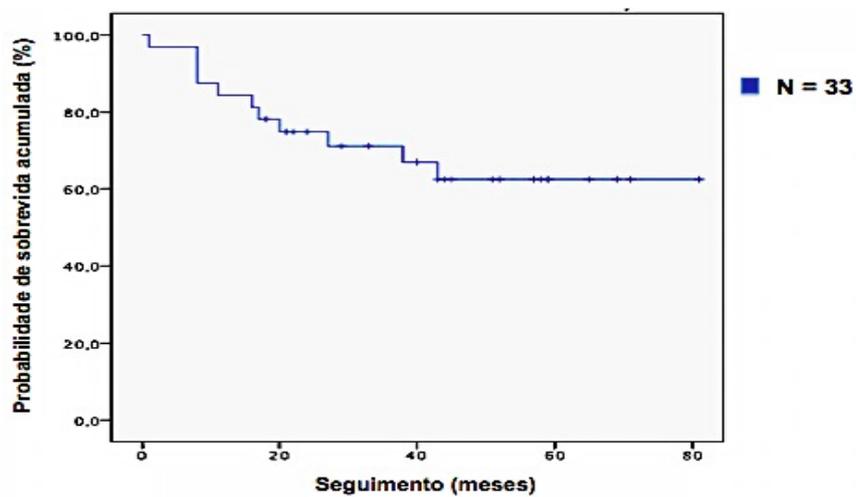
O tempo de seguimento mediano para todos os pacientes foi de 37,1 meses e, para os pacientes não metastáticos ao diagnóstico, foi de 42 meses. Dois óbitos ocorreram com menos de dois meses do início do tratamento, sendo um deles por toxicidade à QT e, o segundo, por progressão sistêmica fulminante, após o segundo ciclo do esquema proposto.

Excluindo-se os pacientes metastáticos ao diagnóstico (n=9), 23 pacientes (69,7%) não apresentaram recidiva local ou à distância; 10 (30,3%) evoluíram com recidiva pulmonar; 3 pacientes evoluíram com recidiva local, todos metastáticos ao diagnóstico. Nenhum paciente inicialmente tratado com intenção curativa apresentou recidiva local. Para os pacientes não metastáticos ao diagnóstico, a Sobrevida Global (SG) foi de 87,9% e 78,1% em 3 e 5 anos, e a Sobrevida Livre de Recorrência à Distância (SLRD) foi de 66,9% e 62,5% em 3 e 5 anos respectivamente. (Figura 9-A e B). Para os pacientes que se apresentaram com metástases ao diagnóstico, a SG em 3 anos foi de 25,9% com mediana de 31 meses (Figura 9C).

A



B



C

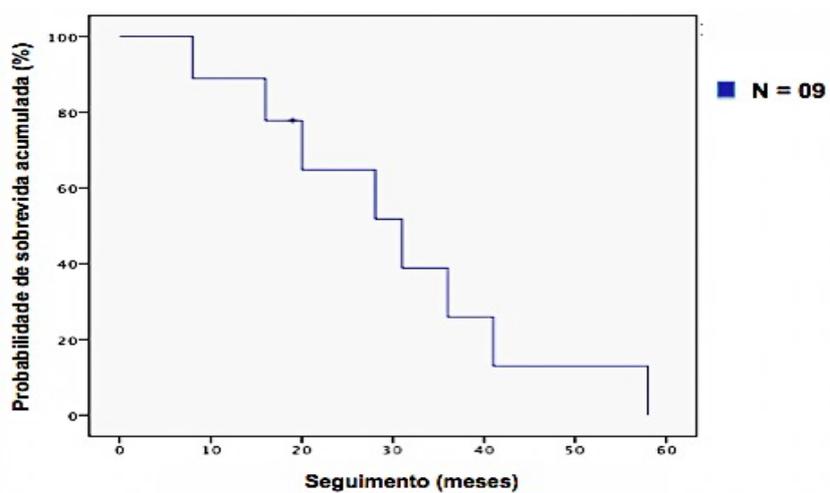


Figura 9 - Curvas de SG e SLRD para os pacientes não metastáticos (n=33) (A e B), e de SG para os pacientes metastáticos (n=9) (C).

Nove pacientes se apresentavam com metástases à admissão, todas pulmonares. Apenas um paciente deste grupo encontra-se vivo até o momento, recebendo QT paliativa e contabilizando 17 meses de seguimento. As curvas de SG comparando pacientes metastáticos vs não metastáticos estão mostradas na Figura 10.

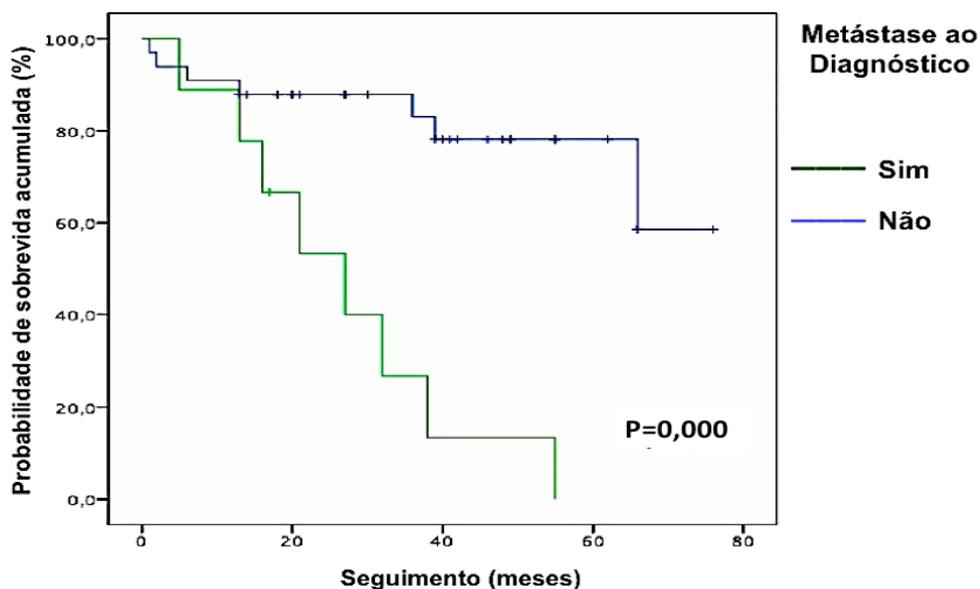


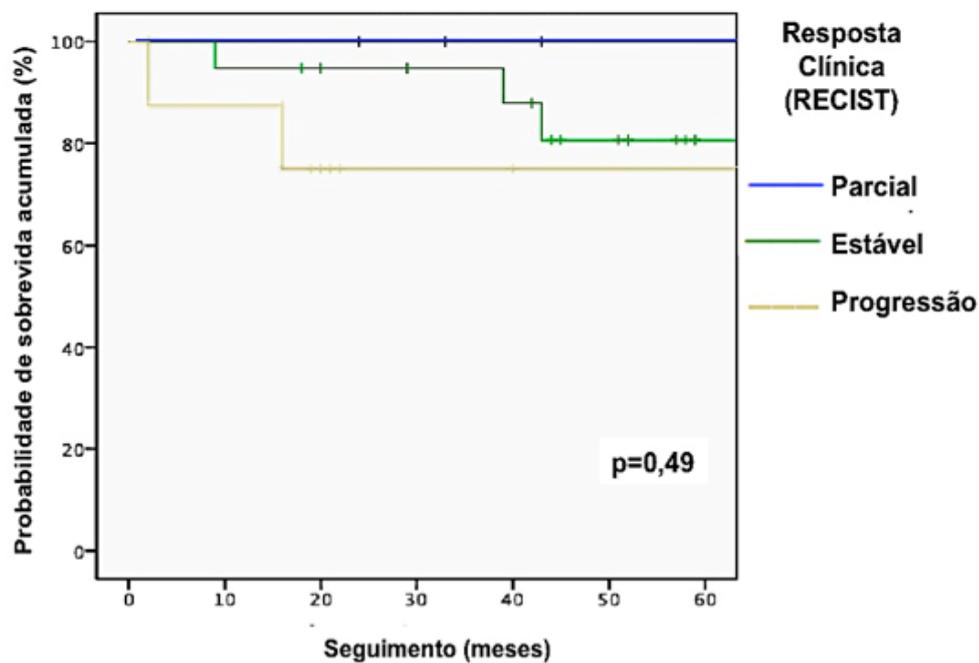
Figura 10 - Curva de SG para pacientes submetidos à QT pré-operatória (n=42), de acordo com a presença ou não de metástases ao diagnóstico.

5.2 REALIZAÇÃO DA QUIMIOTERAPIA, RESPOSTA CLÍNICA E TOXICIDADE

Na Tabela 3 estão mostrados os dados referentes à quimioterapia, toxicidade, resposta clínica e patológica. Utilizando os critérios estabelecidos pelo RECIST (THERASSE et al. 2000), 31 pacientes (75,6%); tiveram resposta parcial ou doença estável após o início do tratamento. Todos os pacientes que tiveram resposta parcial (N=7) completaram 3 ou 4 ciclos de quimioterapia, enquanto, dos pacientes com doença estável após a neoadjuvância (N=23), apenas um não fez 3 ou 4 ciclos. Com relação aos pacientes com progressão de doença (n=10) ao RECIST, 9 apresentaram progressão local e um caso apresentou progressão sistêmica. Destes pacientes, 8 foram submetidos a apenas 2 ciclos de quimioterapia. Nenhum caso com progressão de doença local ao RECIST apresentou menos de 10% de células viáveis, com 3 evoluindo com recidiva sistêmica até o momento.

Dos casos não metastáticos possíveis de serem reavaliados (n=32), 5 tiveram resposta parcial, 19 doença estável e 8 progressão de doença. A SG em 5 anos foi de 100% (resposta parcial), 80% (doença estável), 75% (progressão de doença) e a SLRD foi de 100%, 69,8% e 50% para resposta parcial, doença estável e progressão, respectivamente. Apesar da diferença apresentada, esta não foi significativamente estatística entre pacientes que apresentaram resposta clínica, mantiveram doença estável ou progrediram ao RECIST (Figura 11).

A



B

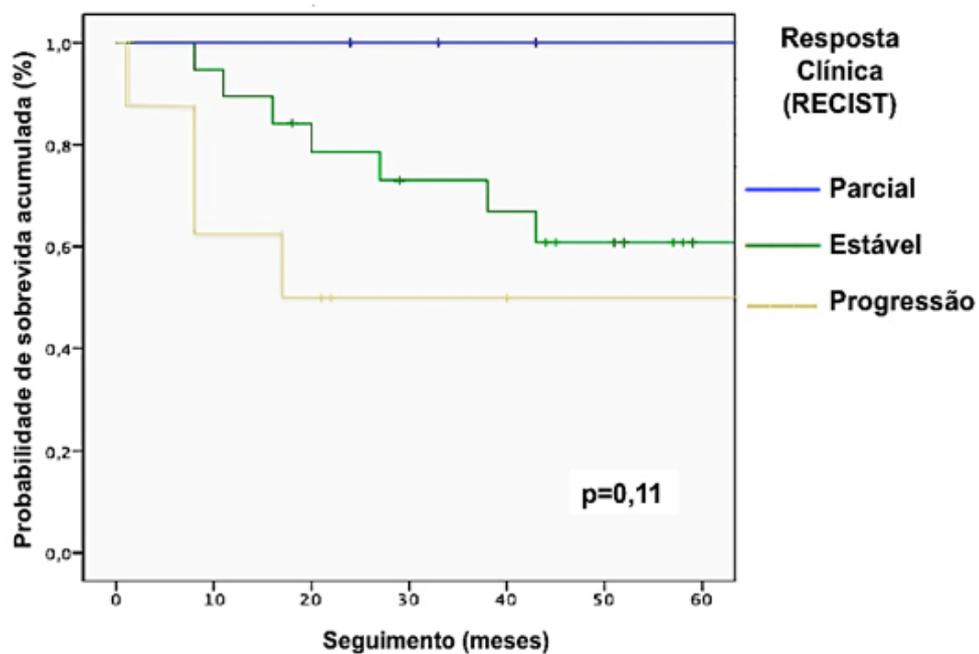


Figura 11 - Curvas de SG (A) e SLRD (B) para 32 pacientes não metastáticos, portadores de SPM de alto grau em membros, submetidos à QT pré-operatória, de acordo com a resposta clínica (RECIST).

Dos 42 pacientes tratados com QT, 19 (45,2%) apresentaram toxicidade graus 3 e 4, todas relacionadas a parâmetros hematológicos, sendo a leucopenia e a anemia as principais complicações (Tabela 3). Essa toxicidade foi responsável por 4 casos de infecções graves e um óbito, mesmo assim, 33 pacientes (76,2%) completaram pelo menos 3 ciclos de QT. Todas as outras complicações (náuseas, vômitos, diarreia, estomatite, alopecia, alterações de bilirrubina, transaminases, creatinina, além de toxicidade pulmonar, cardíaca e neural) foram de grau 1 e 2. Náuseas (57%) e vômitos (48%) foram as alterações gastrointestinais mais frequentes. Os dados de toxicidade relacionados à QT estão descritos na Tabela 4. 32 ainda foram submetidos a 3 ou 4 ciclos de QT, enquanto 10 foram submetidos a 2 ciclos ou menos. Destes últimos, apenas 2 apresentaram toxicidade grave com um óbito; o outro paciente teve sua cirurgia antecipada. O restante (n=8) teve a cirurgia antecipada por progressão local. Os dados em relação à quantidade de ciclos realizados e resposta patológica estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequência dos dados referentes a quantidade de ciclos, resposta clínico/patológica e toxicidade do esquema de QT pré-operatória

Variável	Categoria	n (%)
Ciclos de QT		
	1-2	10 (23,8)
	3-4	32 (76,2)
Resposta Clínica (RECIST)*		
	Completa	—
	Parcial	7 (17,1)
	Estável	24 (58,5)
	Progressão	10 (24,4)
Resposta Patológica		
-Células viáveis	<= 5%	6 (15,0)
	<=10%	8 (20,0)
	<=30%	15 (37,5)
Toxicidade**		
	Grau1-2	23 (54,8)
	Grau 3-4	18 (42,8)
	Grau 5	1 (2,4)

* Avaliados 41 casos;

** Um óbito por toxicidade a QT.

Tabela 4 - Frequência de toxicidade hematológica e não hematológica, relacionadas ao uso de QT pré-operatória

Variável/categorias	n (%)
Toxicidade Hematológica*	
Anemia	
Grau 3	3 (7,1)
Grau 4	3 (7,1)
Lecopenia	
Grau 3	2 (2,4)
Grau 4	11 (26,2)
Neutropenia**	
Grau 3	4 (9,5)
Grau 4	10 (23,8)
Plaquetopenia	
Grau 3	1 (2,4)
Grau 4	—
Toxicidade não hematológica (Somados valores Grau 1 e 2)	
Cardíaca	4 (9,5)
Infecção***	19 (45,3)
Estomatite	24 (57,1)
Renal	1 (2,4)
Pulmonar	—
Hepática	—
Alopécia	40 (95,2)
GI#	26 (85,7)
Neurológica	—

* Valor no nadir/mm³;

** Contagem absoluta;

*** 4 casos de infecção grave (toxicidade graus 3 e 4) com um óbito;

Náusea – 14 pacientes com toxicidade Grau 2; vômito e diarreia – 7 pacientes com toxicidade Grau 2 cada.

5.3 RESPOSTA PATOLÓGICA

A análise das peças operatórias evidenciou que 6 pacientes (15%) tinham apenas 5% (ou menos) de células viáveis na amostra. Um deles necessitou de RT pré-operatória por aparente progressão ao RECIST. Considerando como corte um valor de 10% ou menos de células viáveis, foram encontrados 8 pacientes, representando 20% dos casos operados. Com um ponto de corte de 30% ou menos tivemos 15 pacientes (37,5%) (Tabela 3). Os valores de SG e SLRD para pacientes não metastáticos com relação à percentagem de células viáveis estão discriminados na Tabela 5. As curvas de SG e SLRD estão mostradas na Figura 12a-c.

Tabela 5 - Distribuição dos dados de SG e SLRD para os pacientes não metastáticos ao diagnóstico (n=33), distribuídos de acordo com a percentagem de células viáveis da peça operatória.

Variável/categoria	n	SG*	P(X ²)	SLRD**	P(X ²)
% de células viáveis					
≤5%	6	100%	0,20	100%	0,06
>5%	25	77,7%		55%	
≤10%	8	100%	0,13	85,7%	0,12
>10%	23	75,3%		56,5%	
≤30%	12	90,9%	0,11	82,5%	0,07
>30%	19	76,7%		50,7%	

* % prevista de pacientes vivos em 5 anos;

** % prevista de pacientes vivos e sem recorrência a distância em 5 anos.

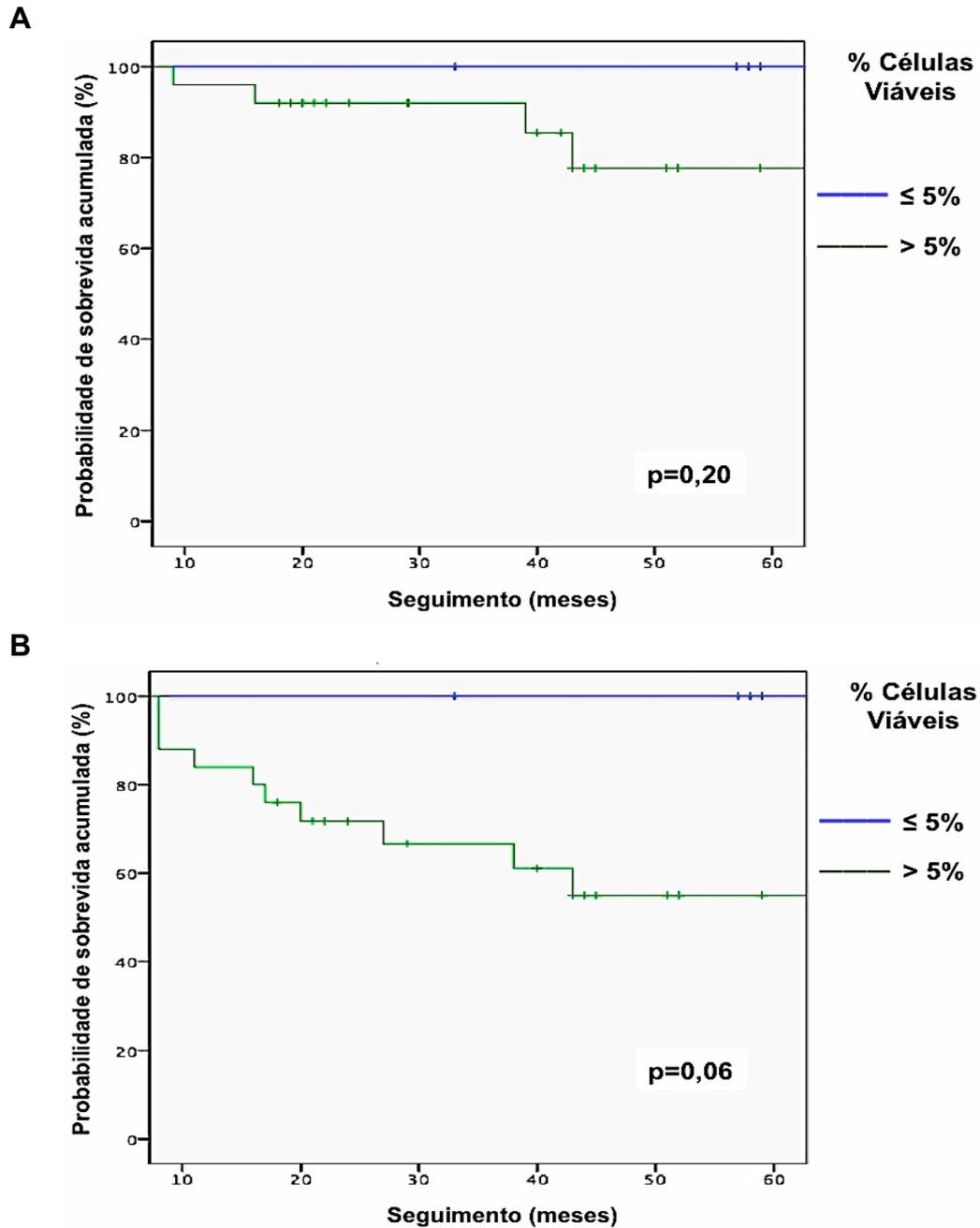


Figura 12a - Curvas de SG (A) e SLRD (B) para 31 pacientes não metastáticos, submetidos à QT pré-operatória, de acordo com a percentagem de células viáveis na peça operatória - ponto de corte 5%.

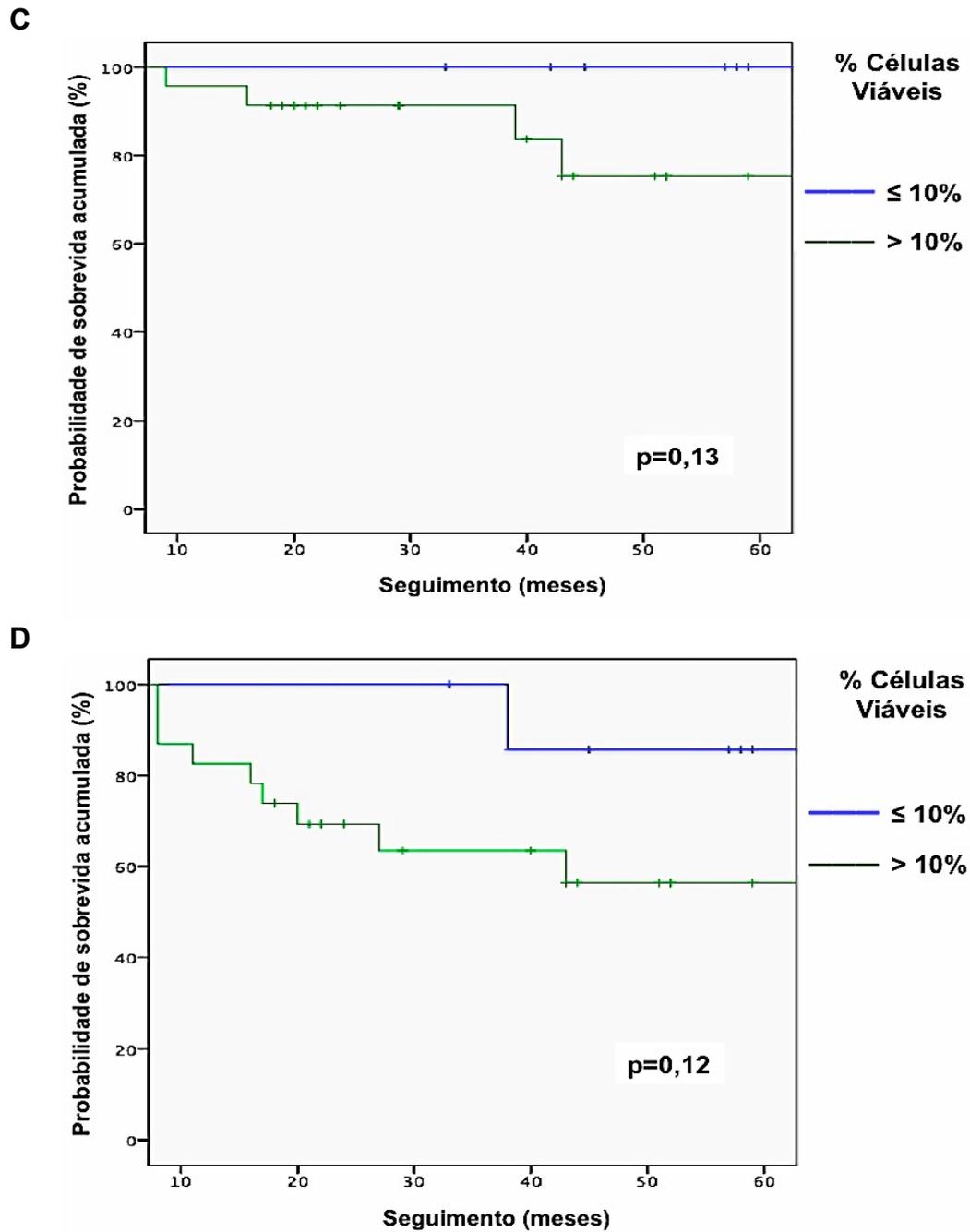
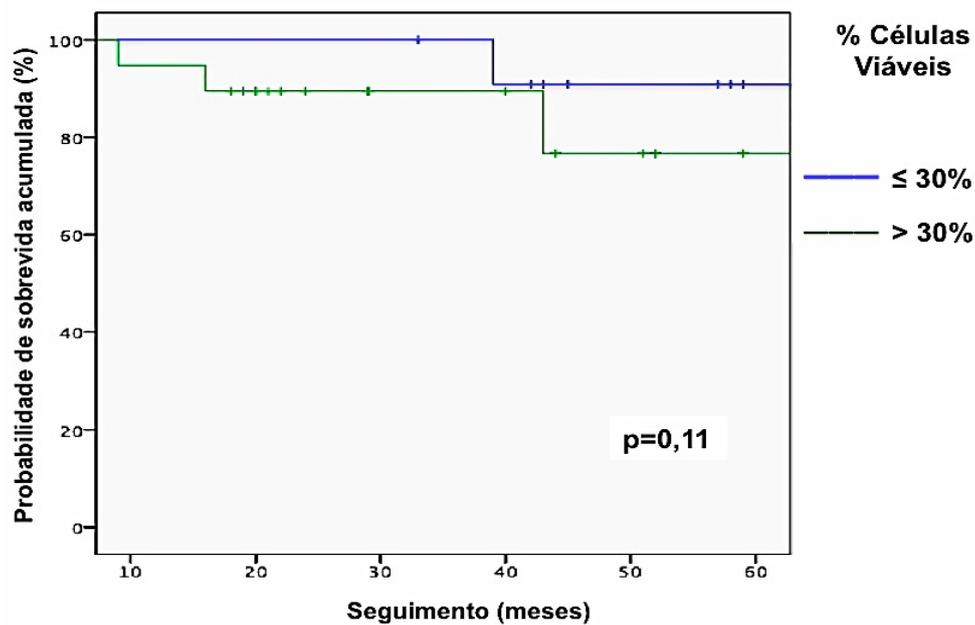


Figura 12b - Curvas de SG (A) e SLRD (B) para 31 pacientes não metastáticos, submetidos à QT pré-operatória, de acordo com a percentagem de células viáveis na peça operatória - ponto de corte 10%.

E



F

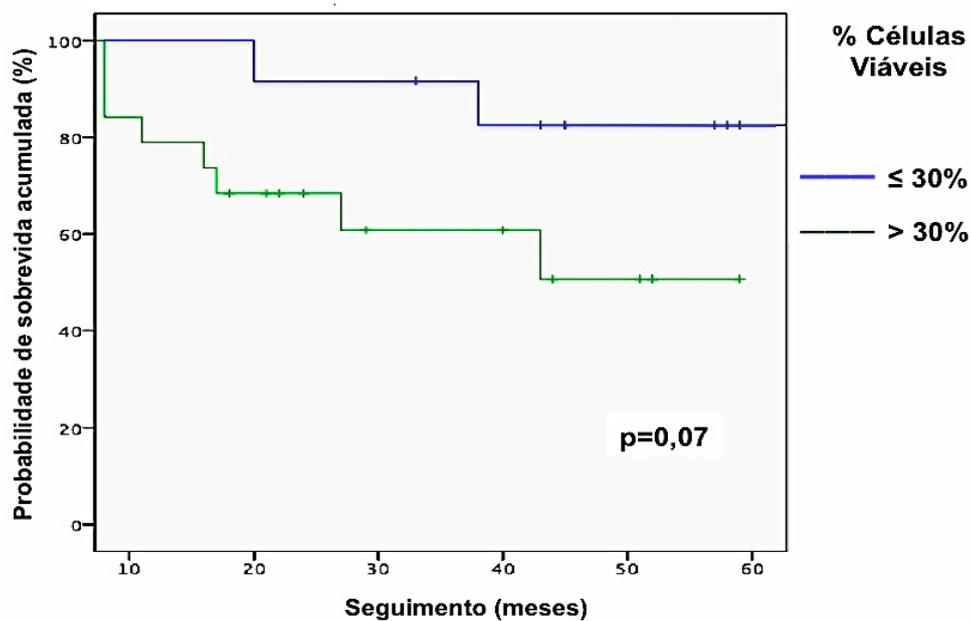


Figura 12c - Curvas de SG (A) e SLRD (B) para 31 pacientes não metastáticos, submetidos à QT pré-operatória, de acordo com a percentagem de células viáveis na peça operatória - ponto de corte 30%.

Para os pacientes metastáticos, a percentagem de células viáveis inferior a 30% não teve relação com SG nem com SLRL.

5.4 CIRURGIA, COMPLICAÇÕES E RADIOTERAPIA

A Tabela 6 mostra os dados referentes aos aspectos cirúrgicos em geral, avaliação de margens, taxa de preservação do membro acometido e recidiva. Destes, 37 (92,5%) pacientes foram submetidos a uma ressecção R0. Apenas 3 (7,5%) pacientes foram submetidos à amputação do membro acometido pelo tumor, sendo um caso considerado passível de ressecção com preservação do membro, na avaliação inicial pela RM (antes da QT pré-operatória). Esse paciente vinha com doença estável em exames de controle na vigência da QT, mas, após o terceiro ciclo, houve uma progressão considerável que, mesmo o paciente recebendo os 4 ciclos previstos, impossibilitou a preservação do membro. Os outros dois casos já tinham indicação prévia de amputação pela avaliação dos exames de imagem.

Entres estes, 9 pacientes tiveram complicação no sítio cirúrgico. Um deles necessitou de reabordagem, por sangramento; 2 apresentaram a formação de seroma local e 8 evoluíram com deiscência, sendo 2 delas relacionadas com infecção do sítio cirúrgico. Apesar disso, apenas um destes casos que apresentou complicação de ferida operatória, não foi submetido à RT pós-operatória. Dos outros 6 pacientes que não receberam RT operatória, 2 tinham sido submetidos à amputação do membro, outros 2

tinham doença metastática ao diagnóstico, uma paciente era portadora de um segundo tumor primário e um paciente recusou o tratamento.

Tabela 6 - Distribuição dos 40 pacientes que foram operados após o tratamento com QT pré-operatória, segundo o tipo de cirurgia realizada, frequência das complicações de ferida operatória (FO), frequência de pacientes que receberam RT adjuvante e do número de pacientes que evoluíram com recorrência local ou à distância.

Variável	Categoria	n (%)
Margens de ressecção		
	R0	37 (92,5)
	R1	3 (7,5)
Preservação do membro		
	Sim	37 (92,5)
	Não	3 (7,5)
Complicação de FO*		
	Sim	9 (22,5)
	Não	31 (77,5)
Radioterapia Adjuvante		
	Sim	33 (82,5)
	Não	7 (17,5)
Recorrência**		
	- Local	3 (7,5)
	- Distância	10 (30,3)

* Complicações: seroma, deiscência, hemorragia e infecção;

** Nove pacientes foram avaliados apenas quanto à recidiva local (N=3) por serem EC IV ao diagnóstico. Para avaliação de recidiva à distância foram excluídos os pacientes metastáticos ao diagnóstico.

A avaliação anatomopatológica dos espécimes cirúrgicos revelou margens microscópicas livres em 37 pacientes (R0). Chamamos de margens livres e exíguas os achados compatíveis com ressecção marginal, menores que 2mm. Esse achado ocorreu em 11 casos. Margem microscópica comprometida (R1) foi encontrada em 3 casos. Dois deles receberam radioterapia local e o um caso foi de um paciente submetido à amputação do membro e não realizou RT pós-operatória. Estudando os pacientes não metastáticos ao diagnóstico, ou seja, com intenção curativa de tratamento, vê-se que não houve diferença significativa em termos de SG e SLRD, quando se compara os pacientes com margens livres e exíguas vs. livres e amplas (Figura 13).

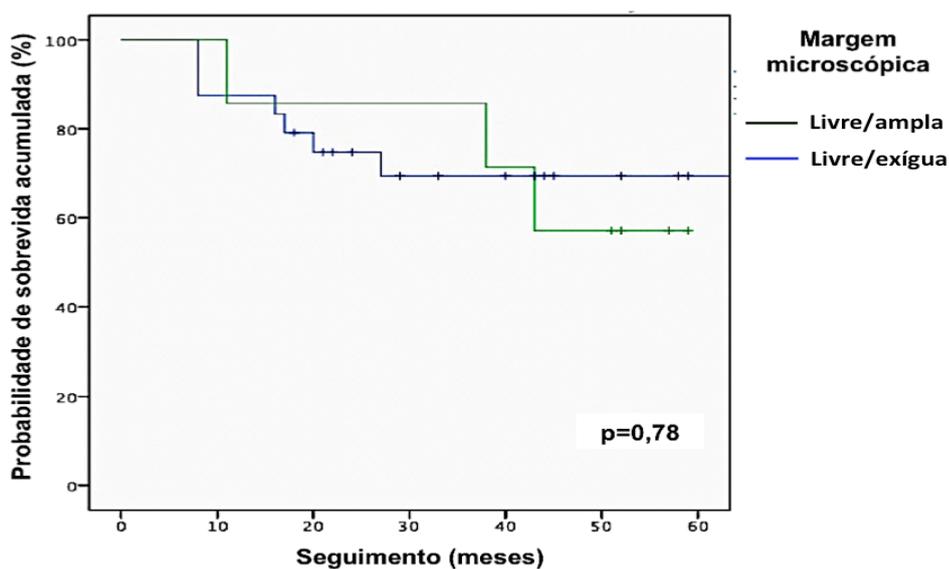


Figura 13 - Curva de SLRD para os pacientes não metastáticos (n=33), de acordo com as margens microscópicas livres e amplas vs. livres e exíguas.

Analisando apenas os pacientes tratados com intenção curativa, conceituados no parágrafo anterior, viu-se que os dados clínicos de tamanho do tumor ($\leq 10\text{cm}$ vs. $>10\text{cm}$) e idade (≤ 50 anos vs. >50 anos) não apresentaram diferença significativamente estatística em termos de SG e SLRD para uma estimativa de 5 anos de seguimento. Apesar disso, 90% dos pacientes com tumores menores que 10cm (n=17) se encontram vivos após 5 anos de seguimento, quando comparados com 64,3% dos pacientes com tumores maiores de 10cm de tamanho (Figura 14).

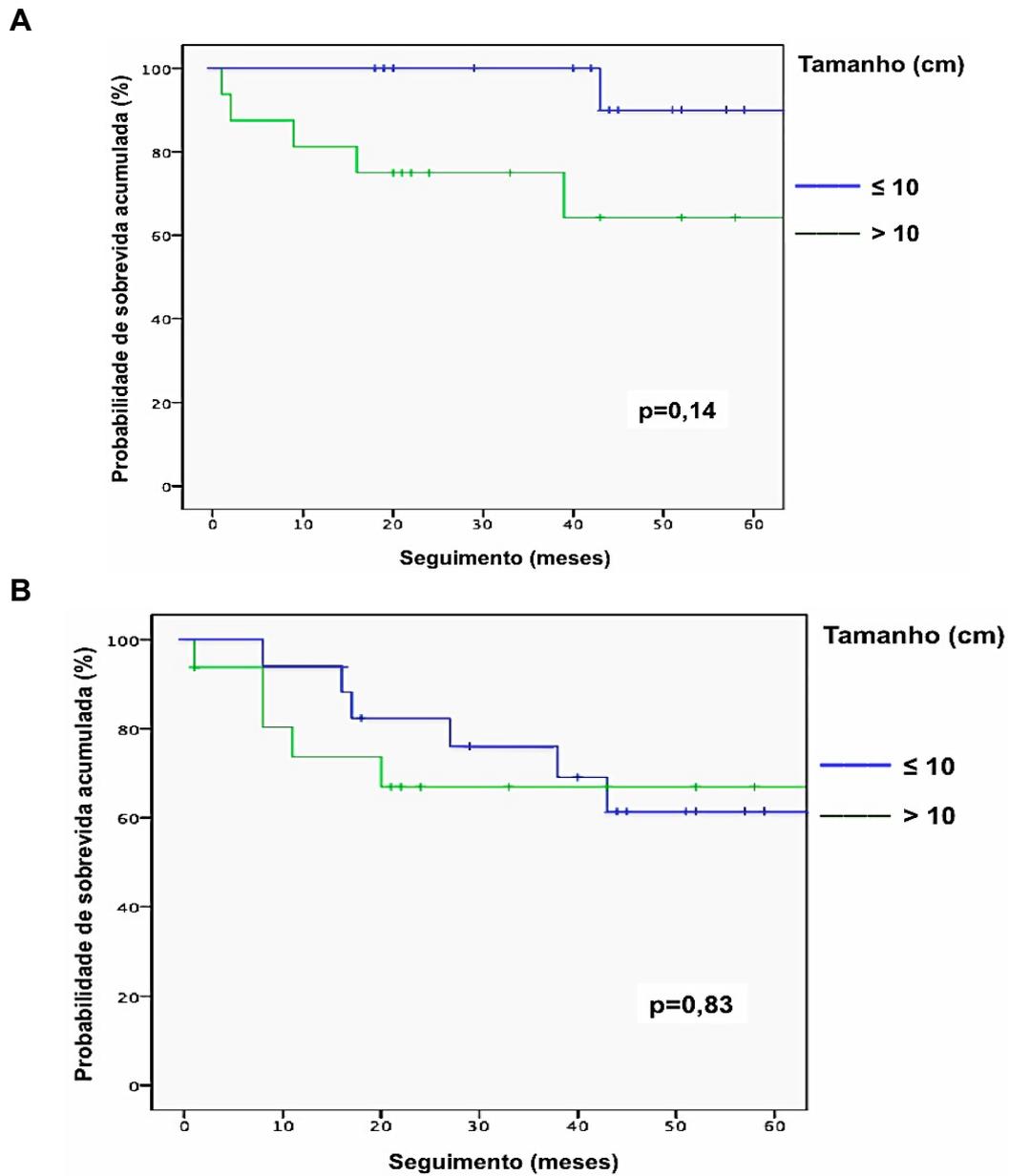
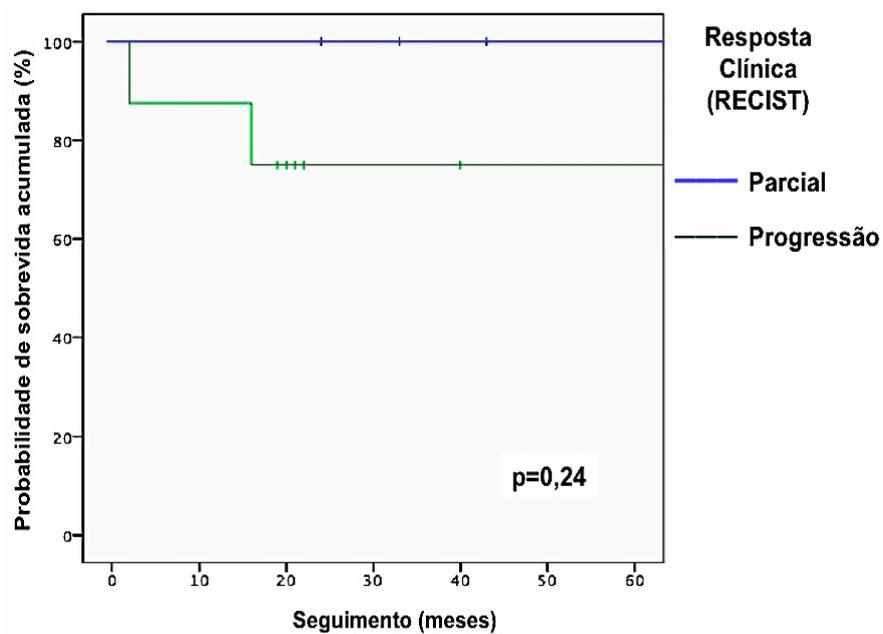


Figura 14 - Curvas de SG (A) e SLRD (B) para os pacientes não metastáticos (n=33), de acordo com o tamanho.

Dentre os pacientes tratados com intenção curativa (n=33), 5 (15%) apresentaram resposta parcial e 8 (24%) progressão de doença ao RECIST na reavaliação após a QT pré-operatória. Os pacientes que foram classificados como "resposta parcial" evoluíram em 100% de SG vs. 75% dos pacientes com progressão de doença (Tabela 7 e Figura 15). Essa diferença foi ainda maior para SLRD, cujos 50% dos pacientes que apresentaram progressão de doença, na vigência da QT pré-operatória, evoluíram com recidiva pulmonar em até 2 anos de seguimento. Apesar desses dados, apenas 2 pacientes com resposta parcial ao RECIST apresentaram menos de 5% de células viáveis na peça cirúrgica (Tabela 8).

A



B

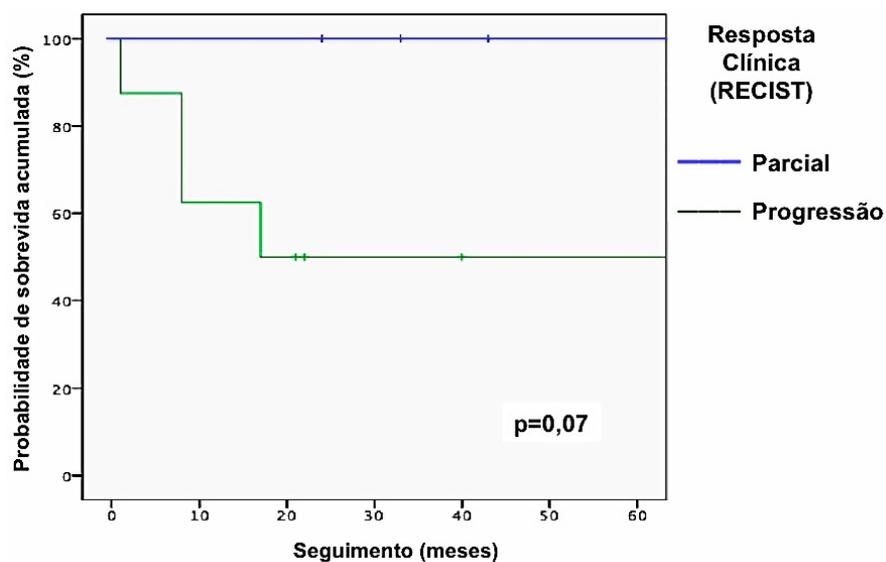


Figura 15 - Curvas de SG (A) e SLRD (B) para os pacientes não metastáticos (n=32), de acordo com a resposta clínica avaliada pelo RECIST (resposta parcial vs. progressão de doença).

Ainda em relação aos pacientes tratados com intenção curativa (n=33), 8 (24%) foram submetidos a apenas um ou 2 ciclos de QT pré-operatória, enquanto 25 (75%) realizaram no mínimo 3 ciclos. O motivo da interrupção do tratamento pré-operatório após o primeiro ou segundo ciclo foi progressão da doença em 6 pacientes (75%), enquanto que 2 (25%) pacientes interromperam o tratamento antes do terceiro ciclo por toxicidade. Não houve diferença em termos de SG e SLRD entre os dois grupos.

Tabela 7 - SG e SLRD para os pacientes não metastáticos ao diagnóstico (n=32), relacionadas com a quantidade de ciclos de QT realizado, dados clínicos e de resposta clínica.

Variável/categorias	n	SG*	P	SLRD*	P
Tamanho (cm)					
≤ 10	17	90,0%	0,14	61,4%	0,83
> 10	16	64,3%		67,0%	
Idade (anos)					
≤ 50	21	87,9%	0,48	58,1%	0,72
> 50	12	68,2%		72,7%	
Resposta Clínica (RECIST)					
Parcial	5	100,0%	0,40	100,0%	0,11
Estável	19	80,6%		60,8%	
Progressão	8	75,0%		50,0%	
Ciclos de QT**					
1-2	8	75,0%	0,28	57,1%	0,32
3-4	25	80,8%		65,3%	

* % prevista de pacientes vivos em 5 anos; ** 33 pacientes avaliados.

Tabela 8 - Variáveis clínicas, distribuídas de acordo com a resposta patológica (percentagem de células viáveis na peça operatória) para os pacientes não metastáticos ao diagnóstico (n=33).

Variável	Categoria	% de células viáveis* – n (%)					
		5%	P(X ²)	10%	P(X ²)	30%	P(X ²)
Tamanho							
	≤ 10 (19)	2 (10,5)	0,66	4 (21,1)	1,00	6 (31,6)	0,52
	> 10 (21)	4 (19,0)		4 (19,0)		9 (42,9)	
Resposta							
(RECIST)	Parcial (7)	2 (28,6)	0,17	2 (28,6)	0,17	5 (71,4)	0,03**
	Progres- são (9)	0 (0)		0 (0,0)		1 (11,1)	
	Estável** (24)	4 (16,7)		6 (25,0)		9 (37,5)	
Ciclos (QT)							
	1-2 (8)	1 (12,5)	1,00	1 (12,5)	1,00	1 (12,5)	0,22
	3-4 (32)	5 (15,6)		7 (21,9)		14 (43,8)	

* Os pontos de corte utilizados para resposta patológica foram: ≤5%, ≤10% e ≤30% de células viáveis. ** O valor de P foi obtido pelo teste X² comparando as variáveis "resposta parcial" vs. "progressão de doença".

5.5 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS TGFβ SMAD4, ID1 E FST

Foram avaliadas pela técnica de imunistoquímica as proteínas TGFβ SMAD4, Id1 e FST. Os resultados referentes à expressão de cada proteína serão mostrados em tópicos separados, a seguir. A Tabela 8 mostra em o número de casos mostrados em que houve expressão ou falta de expressão das proteínas listadas, tanto na peça operatória quanto na biópsia. Foram considerados todos os casos de pacientes operados (N=40) para a análise e

comparação entre a expressão dos marcadores na biópsia e na peça operatória. A comparação da expressão das proteínas na biópsia vs. resposta patológica na peça operatória está demonstrada na Tabela 9.

Tabela 9 - Distribuição dos 40 pacientes foram operados após o tratamento de QT pré-operatória, quanto à expressão das proteínas TGF β , Id1, FST e SMAD4, comparando as amostras de biópsia vs. peça operatória.

Anticorpo	Procedência	Expressão	N (%)	P (McN*)
TGFβ** (citoplasma)	Biópsia	Sim	07 (19,0)	0,62
		Não	30 (81,0)	
	Peça	Sim	08 (24,2)	
		Não	25 (75,7)	
Id1 (Núcleo)	Biópsia	Sim	07 (19,5)	1,00
		Não	29 (80,5)	
	Peça	Sim	01 (3,2)	
		Não	31 (96,8)	
FST (Citoplasma)	Biópsia	Sim	14 (37,9)	0,72
		Não	23 (62,1)	
	Peça	Sim	14 (56,0)	
		Não	11 (44,0)	
SMAD4+ (Núcleo)	Biópsia	Sim	31 (83,7)	1,00
		Não	06 (16,3)	
	Peça	Sim	23 (69,7)	
		Não	10 (30,3)	

* Cálculo de probabilidade obtido usando o teste de McNemar para amostras pareadas para os casos válidos (possíveis de serem avaliados tanto biópsia quanto em peça operatória);

** O valor de P obtido pelo teste de X^2 para as amostras de forma não pareada foi significativo (P=0,002). O mesmo ocorreu para FST com P=0,009;

*** Quando se avaliou se houve queda de marcação forte para o SMAD4 ($\geq 75\%$ de núcleos marcados vs. $< 75\%$) houve diferença significativa nas amostras válidas pareadas, calculada pelo teste de McNemar (P=0,007).

5.5.1 TGF β

Na análise pareada dos 31 casos válidos analisados (possíveis de serem avaliados tanto biópsia quanto em peça operatória), não houve perda

ou ganho da expressão do TGF β , estatisticamente significativa, nas peças operatórias quando comparadas às biópsias (Tabela 8). No entanto a análise não pareada, calculada pelo método de Fisher, mostrou diferença significativa ($P=0,002$) entre a biópsia (virgem de tratamento) e peça (pós QT).

Quanto a expressão (positiva ou negativa) do TGF β nas amostras de biópsia quando correlacionadas à resposta patológica, avaliando apenas os casos operados onde foi possível a realização da IQ ($n=37$), tivemos trinta pacientes com expressão negativa (0 ou +) e sete com expressão positiva (++ ou +++). Dos trinta pacientes com expressão negativa, onze se apresentaram com 30% ou menos de células viáveis na peça cirúrgica. Apenas dois pacientes, dos sete com expressão positiva na biópsia, mostraram valores menores ou iguais 30% de células viáveis na amostra. Essa diferença não foi significativa ($P=1,00$) (Tabela 10).

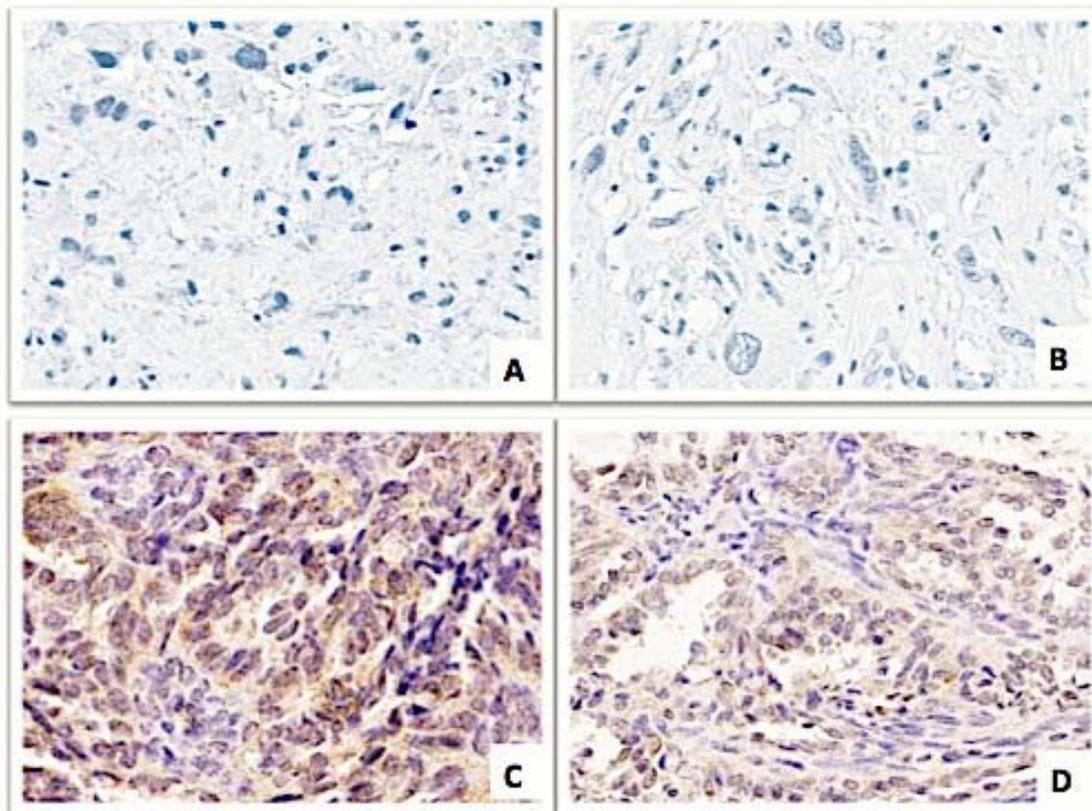


Figura 16 – Fotomicrografia de (A e B) sarcoma pelomórfico e (C e D) sarcoma sinovial com relação à expressão imunohistoquímica para o Ac TGF β em biópsia (pré-tratamento com QT) e peça cirúrgica (pós-tratamento com QT) (40X). A e B – Exemplos de casos negativos (0) para a expressão de TGF β na biópsia (A) e na peça cirúrgica (B). C e D - Exemplos de casos positivos (C +++ e D ++) para a expressão de TGF β na biópsia (C) e na peça cirúrgica (D).

5.5.2 Id1

Tanto para a análise pareada quanto não pareada dos 29 casos válidos analisados, não houve perda ou ganho da expressão do Id1, estatisticamente significativa, nas peças operatórias quando comparadas às biópsias (Tabela 8).

Quanto à expressão (positiva ou negativa) do Id1 nas amostras de biópsia, quando correlacionadas à resposta patológica, avaliando apenas os casos operados onde foi possível a realização da IQ (n=36), houve 29 pacientes com expressão negativa (0 ou 1) e 7 com expressão positiva (2 ou

3). Dos 29 com expressão negativa, 8 (27,6%) se apresentaram com 30% ou menos de células viáveis na peça cirúrgica, enquanto apenas 4 pacientes (57,1%), dos 7 com expressão positiva na biópsia, mostraram valores menores ou iguais a 30% de células viáveis na amostra. Essa diferença não foi significativa ($P=0,19$) (Tabela 10).

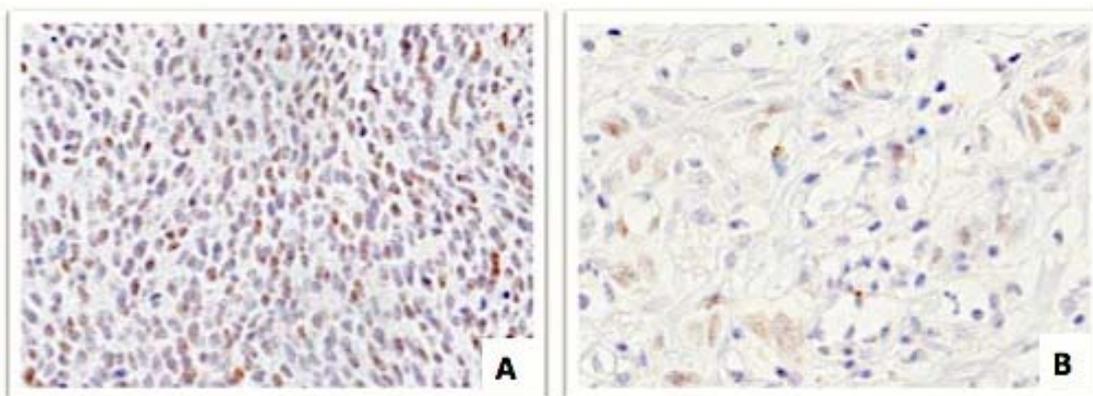


Figura 17 - Fotomicrografia de sarcoma fusocelular com relação à expressão imunohistoquímica nuclear para o Ac Id1 (A – 10X e B – 40X). A e B – Exemplos de caso positivo (3) (A - biópsia) e negativo (1) (B – peça cirúrgica) para a expressão de Id1 nuclear.

5.5.3 FST

Na análise pareada dos 33 casos válidos analisados, não houve perda ou ganho da expressão do FST, estatisticamente significativa, nas peças operatórias quando comparadas às biópsias (Tabela 8). No entanto a análise não pareada, calculada pelo método de Fisher, mostrou diferença significativa ($P=0,009$) entre a biópsia (virgem de tratamento) e a peça (pós-QT).

Quanto à expressão (positiva ou negativa) do FST nas amostras de biópsia quando correlacionadas à resposta patológica, avaliando apenas os casos operados onde foi possível a realização da IQ ($n=37$), houve 23

pacientes com expressão negativa (0 ou +) e 14 com expressão positiva (++ ou +++). Dos 23 pacientes com expressão negativa, 7 (30,4%) se apresentaram com 30% ou menos de células viáveis na peça cirúrgica; enquanto 6 pacientes (42,9%), dos 14 com expressão positiva na biópsia, mostraram valores menores ou iguais a 30% de células viáveis na amostra. Essa diferença não foi significativa ($P=0,49$) (Tabela 10).

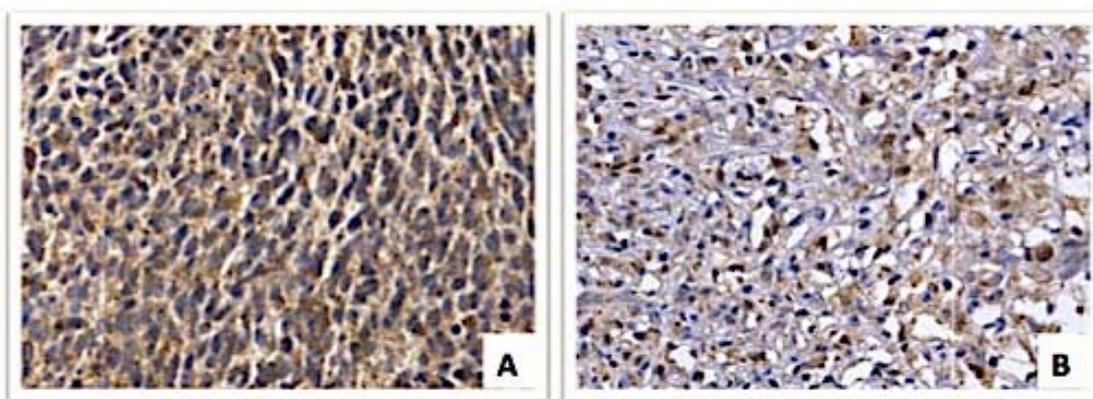


Figura 18 - Fotomicrografia de sarcoma sinovial com relação à expressão imunoistoquímica para o Ac FST (10X).

A e B – Exemplos de casos positivos para a expressão de FST, sendo avaliado como +++ na biópsia (A) e ++ na peça cirúrgica (B).

5.5.4 SMAD4 (nuclear)

Na análise pareada dos 32 casos válidos, não houve perda ou ganho da expressão do SMAD4, estatisticamente significativa, nas peças operatórias quando comparadas às biópsias (Tabela 8). No entanto a análise, ainda pareada, avaliando apenas a queda de marcação forte ($\geq 75\%$ de núcleos marcados vs $< 75\%$) calculada pelo método de McNemar, mostrou diferença significativa ($P=0,007$) entre a biópsia (virgem de tratamento) e a peça (pós-QT).

Quanto à expressão (positiva ou negativa) do SMAD4 nas amostras de biópsia quando correlacionadas à resposta patológica, avaliando apenas os casos operados onde foi possível a realização da IQ ($n=37$), houve 6 pacientes com expressão negativa (0 ou 1) e 31 com expressão positiva (2 ou 3). Dos 6 com expressão negativa, 2 (33,3%) se apresentaram com 30% ou menos de células viáveis na peça cirúrgica, enquanto 11 pacientes (35,5%), dos 31 com expressão positiva na biópsia, mostraram valores menores ou iguais 30% de células viáveis na amostra. Essa diferença não foi significativa ($P=1,00$) (Tabela 10).

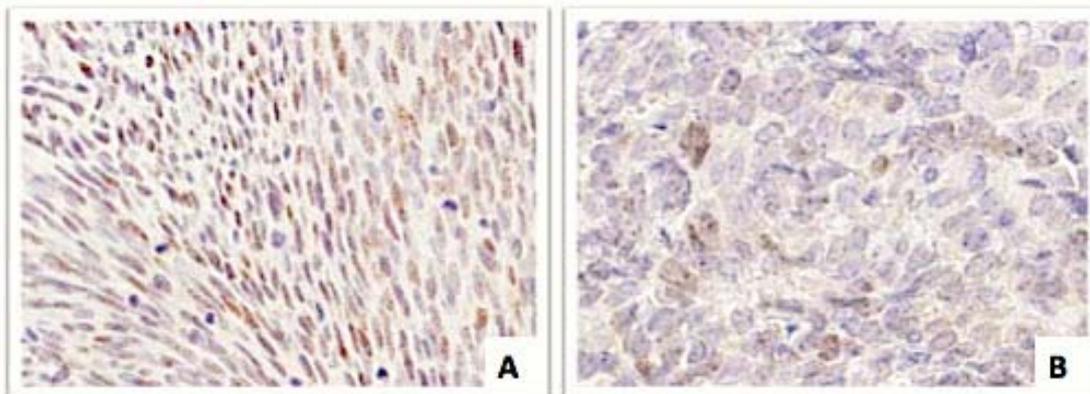


Figura 19 - Fotomicrografia de sarcoma fusocelular com relação à expressão imunohistoquímica para o Ac SMAD4 (A – 10X e B – 40X).

A e B – Exemplos de caso positivo (3) (A - biópsia) e negativo (1) (B – peça cirúrgica) para a expressão de SMAD4 nuclear.

Tabela 10 - Casos categorizados quanto à expressão das proteínas TGF β , Id1, FST e SMAD4, distribuídos de acordo com a resposta patológica (amostras de biópsia).

Ac*	Expressão(n)	% de células viáveis** – n (%)					
		5%	P(X ²)	10%	P(X ²)	30%	P(X ²)
TGFβ (N=37)	Sim (7)	1 (14,3)	1,00	2 (28,6)	0,59	2 (28,6)	1,00
	Não (30)	4 (13,3)		5 (16,7)		11 (36,7)	
Id1 (N=36)	Sim (7)	2 (28,6)	0,24	3 (42,9)	0,11	4 (57,1)	0,19
	Não (29)	3 (10,3)		4 (13,8)		8 (27,6)	
FST (N=37)	Sim (14)	3 (21,4)	0,34	3 (21,4)	1,00	6 (42,9)	0,49
	Não (23)	2 (8,7)		4 (17,4)		7 (30,4)	
SMAD4 (N=37)	Sim (31)	5 (16,1)	0,56	6 (19,4)	1,00	11 (35,5)	1,00
	Não (6)	0 (0,0)		1 (16,7)		2 (33,3)	

* Ac – Anticorpo;

** Os pontos de corte utilizados para resposta patológica foram: $\leq 5\%$, $\leq 10\%$ e $\leq 30\%$ de células viáveis.

6 DISCUSSÃO

O prognóstico de pacientes com SPM de alto grau em extremidades ainda é precário, principalmente, por causa das recaídas à distância, apesar da melhora significativa obtida ao longo do tempo quanto ao controle local da doença (PISTERS et al. 2007). A QT neoadjuvante, apesar de ser um tratamento não padrão, pode tanto facilitar a ressecção do tumor com margens adequadas, a exemplo da radioterapia, como combater precocemente a doença micrometastática. Com estes argumentos, o número de centro que trata SPM com QT de indução, está crescendo, principalmente, para lesões com potencial risco de ressecções inadequadas sem nenhuma terapia inicial, os tumores de alto grau com risco aumentado para metástases (EILBER et al. 2001; GOMEZ et al. 2004).

Deve-se lembrar de que, tratando-se de doença rara, os SPM são, na maioria dos estudos, separados em dois grupos principais: alto grau e baixo grau. Essa divisão guia a terapêutica na grande maioria dos pacientes. Os tumores de baixo grau, quando tratados com ressecção tridimensional adequada, dificilmente evoluem com recidiva local ou à distância. Enquanto os de alto grau têm um comportamento bem mais agressivo, com 50% deles recaindo a distância apesar das terapias instituídas. Além disso, outros fatores, como o tamanho do tumor; profundidade do tumor em relação à fáscia muscular; e presença ou não de metástases, se correlacionam com recaída e óbito (COINDRE et al. 2001) O grau histológico é considerado o

fator prognóstico mais importante. Ele é usado também como fator preditivo de resposta às terapias citotóxicas, prevendo-se melhores taxas de resposta em tumores de alto grau (CORMIER et al. 2004).

Entretanto, também, na prática clínica, observa-se altas taxas de necrose induzida por RT ou QT em alguns tumores de baixo grau ou resultados desanimadores nos de alto grau. Portanto, o valor preditivo do grau histológico para rádio ou quimiossensibilidade não pode ser considerado ótimo. WEITZ et al. (2003) mostraram que, apesar dos avanços, a sobrevida dos pacientes com SPM permanece praticamente a mesma, apenas com ganho em preservação de membro, mas não em sobrevida global, fato atribuído a esquemas de QT estanques. No entanto, a aplicabilidade de QT permanece justificada nesses tumores, ficando o tipo histológico, ainda, em segundo plano, mesmo sabendo que alguns tipos histológicos respondem diferentemente a quimioterápicos específicos e com expressões moleculares distintas (KOEI et al. 2003), até que drogas mais direcionadas sejam postas em prática clínica. Diante dessa situação, deparamo-nos com duas opções: ou se melhoram as drogas para tratamento dos sarcomas, ou se selecionam melhor os pacientes, baseando-se não apenas no grau, mas em subtipos histológicos ou marcadores biológicos por exemplo.

Numa visão mais direcionada aos diferentes tipos histológicos e à presença de alterações moleculares específicas, acredita-se que, a partir de informações moleculares, se passe a tratar diferentemente os sarcomas, de uma forma mais individualizada, do ponto de vista quimioterápico,

principalmente, orientado por fatores preditivos mais acurados. Há um aumento do número de publicações em oncologia fundamentadas em estudos de biologia molecular. A oncologia moderna caminha na tentativa de estabelecer o perfil biológico dos tumores para direcionar o tratamento, é o que se denomina de terapia individualizada. Em muitos casos houve verdadeiras revoluções terapêuticas fundadas em achados moleculares. É o exemplo dos tumores estromais gastrointestinais (GIST's) em que mutações específicas direcionam doses terapêuticas e utilização de terapia-alvo com excelente eficácia em controle da doença e sobrevida (CORLESS et al. 2011).

Uma outra forma de investigação se dá pela busca de alterações cromossômicas. Na introdução deste trabalho viu-se que a identificação de translocações cromossômicas pode ter valor prognóstico (KELLY et al.1997; GINSBERG et al. 1999; LADANYI et al. 2002; OTTAIANO et al. 2005 MATSUMINE et al. 2007).

Para SPM, o valor prognóstico de marcadores moleculares, assim como a avaliação de resposta a terapias, ainda, são pouco frequente, mesmo sabendo que o objetivo de estabelecer marcadores biológicos preditores de resposta em substituição à resposta patológica seja promissor (MERIMSKY et al. 2002; OTTAIANO et al. 2005; RODRIGO et al. 2011). Em cenários de neoadjuvância, um estudo revelou a expressão da *multidrug resistance glicoprotein 1* (MDR1) em pacientes de pior evolução (JIMENEZ et al. 1999); e um outro, que avaliou a perda ou ganho do ErbB-4, após a terapia de indução, mostrou pior evolução em pacientes com aumento da

expressão desse marcador nas peças operatórias (MERIMSKY et al. 2002). Com relação à doxorrubicina, têm sido estudados alguns marcadores com possível papel preditor em resposta, tendo em vista que a possível resistência da droga seja devida a anormalidades bioquímicas envolvendo interação droga-DNA e reparo (PAIK et al. 2000; DI LEO et al. 2001; DURBECQ et al. 2004).

Neste estudo, buscou-se avaliar a expressão proteica, pela técnica de IQ, dos genes (TGF β , FST, Id1) pertencentes à via de sinalização mediada por TGF β , tendo em vista que tais genes foram identificados como superexpressos em pacientes não respondedores à QT neoadjuvante a partir de uma análise de microarray, realizado Núcleo de Sarcomas do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C. Camargo (AGUIAR JR. 2007). O grande problema enfrentado naquela ocasião foi o pequeno número de casos avaliados. Além disso, a identificação da via mediada por TGF β , comprovadamente, tem papel fundamental na carcinogênese de diversas neoplasias, incluindo sarcomas, o que estimulou a permanecer nessas linha de investigação. Avaliou-se também a expressão do SMAD4 nuclear, porque se considerou um gene essencial ao funcionamento da via, uma vez que carrega o complexo ativado da via canônica SMAD2/3 para o núcleo.

Como visto anteriormente, a via mediada por TGF β tem atividade supressora de proliferação em células epiteliais, porém promove a invasão e as metástases durante as fases de progressão tumoral. A perda de resposta ao efeito inibitório, ou supressor tumoral, desta via está associada ao

aumento de expressão dos ligantes no microambiente tumoral ou a mutações nos receptores de membrana (BIERIE e MOSES 2006). A metodologia aplicada anteriormente permitiu apenas identificar que membros da via do TGF β se encontravam significativamente superexpressos em pacientes não respondedores à quimioterapia neoadjuvante, mas não permitiu determinar exatamente que funções ou capacidades esses tumores perderam ou adquiriram, em razão da multiplicidade funcional da via.

Foi observado, naquela ocasião, que dentro da via do TGF β , alguns genes identificados como diferentemente expressos tinham atividades opostas. Houve, paradoxalmente, um aumento da expressão, tanto do próprio ligante TGF β 1, como de alguns de seus inibidores (FST e LTBP1), como aumentados em expressão nos tumores resistentes à quimioterapia. Apesar da identificação da via defeituosa, não foi possível determinar quais genes mais influenciaram na alteração. Portanto, um aumento do número de casos; estudar mais especificamente cada gene; qual o real papel deles no processo de carcinogênese em sarcoma; e ver quais aplicabilidades clínicas serão possíveis, se fazem necessárias.

Uma revisão publicada em por HELDIN et al. (2004) mostrou que tanto a formação de novos vasos, quanto a formação de matriz extracelular induzida por TGF β , aumenta a pressão do fluido intersticial no microambiente tumoral. Esse é um fator limitante, por exemplo, na penetração de quimioterápicos no tumor. Nesse sentido, o emprego de anti-angiogênicos ou inibidores de atividade de TGF β em combinação com quimioterápicos convencionais, com objetivo de diminuir a pressão

intersticial, pode facilitar a penetração de drogas citotóxicas no tumor, o que parece ser uma estratégia interessante a ser testada em ensaios clínicos futuros. Um inibidor seletivo da atividade de quinase do receptor tipo 1 de TGF β já vem sendo testado com sucesso em experimentos animais (GE RONGRONG et al. 2006).

6.1 RESPOSTA ANATOMOPATOLÓGICA

Determinar se a resposta patológica, representada por necrose tumoral, induzida por alguma modalidade de tratamento tem relação com a sobrevida ou à recorrência local, é tema de muitos estudos anteriormente publicados na literatura. A resposta patológica após a terapia de indução é um poderoso preditor de sobrevida em tumores ósseos (ROSEN et al. 1982). Contudo, tratando-se de SPM, a dificuldade em avaliar essa resposta, tendo em vista que muitos tumores já possuem uma grande percentagem de necrose, mesmo sem terapia alguma, e as classificações vigentes para tumores ósseos usam valores de 50%, 95% e mais de 95%, como pontos de corte para avaliação de resposta (EILBER et al. 2001; ISSELS et al. 2001; GOMEZ et al. 2004; MENENDEZ et al. 2007).

Em sarcomas de partes moles, um dos primeiros trabalhos sobre o tema foi publicado por EILBER et al. (2001). Foi um estudo retrospectivo com 496 pacientes, todos portadores de sarcomas de alto grau em extremidades e submetidos a tratamento neoadjuvante com RT e QT (quatro esquemas baseados em doxorubicina). Tanto sobrevida livre de doença

local quanto sobrevida global foram significativamente melhores nos pacientes com mais de 95% de necrose na peça operatória. Além disso, os pacientes com percentuais de necrose menores que 95% tinham 2,51 vezes mais chances de desenvolverem recorrência local e 1,86 vezes de morrerem pela doença. A adição de ifosfamida ao esquema aumentou de 13% para 48% a percentagem de pacientes com 95% ou mais de necrose no espécime cirúrgico. O mesmo autor mostrou benefício em sarcomas retroperitoneais, 25% dos casos foram considerados respondedores com resposta patológica maior que 95% de necrose. Esse grupo de pacientes teve melhora significativa em sobrevida específica por câncer em relação aos demais (DONAHUE et al. 2010).

Um outro estudo, com 48 pacientes adotou também RT e QT neoadjuvante e correlacionou com a resposta patológica. Foi adotado como esquema de QT a combinação de doxorubicina (20 mg/m²); ifosfamida (2,0 g/m²); e dacarbazina (250 mg/m²) (MAID), em três ciclos pré-operatórios concomitantes à radioterapia, seguidos por cirurgia. Todos os pacientes eram portadores de sarcomas de alto grau de extremidades maiores que 8cm (DELANEY et al. 2003). Quando comparados com a resposta radiológica, utilizando os critérios do RECIST (THERASSE et al. 2000), a resposta patológica não teve relação significante. Pelo RECIST houve resposta parcial em 10,6% dos casos e nenhuma resposta completa foi observada. Cerca de 13% dos pacientes apresentaram progressão da doença. No entanto, quanto à avaliação anatomopatológica, os autores encontraram necrose maior de 99% em 29% dos pacientes. Além disso, dos

seis pacientes que haviam apresentado progressão radiológica, todos apresentavam necrose maior que 50% nas peças cirúrgicas (DELANEY et al. 2003).

Apesar de, aparentemente, com a associação da RT, atingir-se maiores índices de necrose tumoral, alguns autores que defendem tratamento sistêmico exclusivo com QT questionam da necessidade da RT em pacientes bons respondedores. HENSHAW et al. (2001) avaliou pacientes com sarcoma de alto grau em extremidades que foram submetidos à terapia intra-arterial (cisplatina) e sistêmica (ifosfamida e doxorubicina), seguidos de cirurgia. Não foi usada RT para os pacientes com boa resposta patológica e margens livres. Dos 33 pacientes estudados, a mediana de necrose tumoral foi de 95%. Apenas duas recorrências locais foram detectadas. A sobrevida livre de recaída local foi de 80% em 5 anos e de 88% em 10 anos de seguimento.

De modo contrário, outros estudos não conseguiram associar resposta patológica à sobrevida. Um deles foi um estudo prospectivo que avaliou 22 pacientes com sarcomas de extremidade e de alto grau, que receberam um esquema neoadjuvante com RT e QT. Após três ciclos de QT com doxorubicina e ifosfamida e RT (28Gy), os pacientes foram submetidos à cirurgia. Foi atingido um índice de 40% de resposta patológica com mais de 95% de necrose na peça operatória, no entanto, sem significância nos sobrevida global ou livre de doença (RYAN et al. 2008).

Um outro trabalho, retrospectivo, analisou o valor da percentagem de necrose em 82 pacientes submetidos à quimioterapia neoadjuvante. Os

autores foram enfáticos em afirmar que não houve diferença significativa em sobrevida livre de recidiva ou sobrevida global em relação à percentagem de necrose na peça operatória menor ou maior que 95% (MENENDEZ et al. 2007).

Como visto anteriormente, EILBER et al. (2001) dividiram a resposta patológica em três grupos: $\geq 95\%$ de necrose, $< 95\%$ de necrose; e ausência de tumor residual. No presente estudo, optou-se por separar, em percentis da peça operatória, a quantidade de fibrose, necrose e presença de células viáveis. Calculou-se que seria um modo mais claro de descrição dos achados anatomopatológicos, mesmo sabendo que, de certa forma, são os mesmos critérios adotados por Eilber, tendo em vista que ele utilizou o dado “percentagem de necrose” de modo relativo ao “percentual de células viáveis”, como anteriormente descrito, para avaliar a resposta patológica em tumores ósseos (HUVOS 1991; WUNDER et al. 1998). Provavelmente, as áreas de fibrose indicam áreas de morte celular induzida pela QT que cicatrizaram ao final do tratamento. Não se pode inferir o mesmo para as áreas de necrose. No entanto avaliar isoladamente fibrose não teve qualquer significância em dados de sobrevida.

Neste estudo foram utilizados como pontos de corte 5%, 10% e 30% de células viáveis remanescentes na peça operatória. Escolheram-se esses valores porque eles se mostraram tendenciosos ou com significância estatística em dados de sobrevida, somados à evidência de que a maioria dos trabalhos mostraram pontos de corte que variam de 5% a 30% (RODRIGO et al. 2011). Em 8 pacientes, a percentagem de células viáveis

foi menor que 10%. Destes, apenas um recaiu à distância após 2 anos de tratamento. Todos estão vivos até o momento. Para os pacientes com 30% ou menos de células viáveis nas amostras de peças operatórias, a SLD e SG em 5 anos foi de 82,5% e 90,9%, respectivamente. Analisando valores acima de 50%, não houve curvas de sobrevida com diferença significativa. Pode-se observar, portanto, que repostas patológicas abaixo de 30% de células viáveis se correlacionaram com taxas elevadas de SG e SLRD em 5 anos. Não se pôde correlacionar esta resposta com tipos histológicos. Houve casos de sarcoma sinovial, por exemplo, em que se obteve resposta patológica completa (0% de células viáveis); e outros em que não houve resposta alguma (100% de células viáveis na peça operatória).

Sem dúvida, a avaliação da resposta patológica é importante para correlação com o prognóstico, no entanto, a busca de marcadores moleculares preditivos de resposta vem sendo acrescentada a dados de resposta patológica (RODRIGO et al. 2011). A avaliação desses marcadores, não somente em peças operatórias para possível correlação com sobrevida, mas em material de biópsias sem tratamento poderia identificar melhor os pacientes respondedores ou não.

6.2 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

A análise de frequência de dados mostrou uma diminuição da expressão de alguns dos marcadores avaliados, principalmente do SMAD4 nuclear, na peça cirúrgica quando comparado às amostras da biópsia

correspondente. Esse fato despertou o questionamento de que a ação da QT pré-operatória poderia ter o papel de inibir a migração do complexo SMAD2 e 3/4 ao núcleo, o que causaria uma queda na expressão nuclear do SMAD4. O próximo passo, então, era ver se essa queda na expressão era estatisticamente significativa. Um problema óbvio se deu quando da avaliação dos casos com 0% de células viáveis. Apesar de se constatar que em todos esses casos havia expressão do SMAD4 nuclear nas biópsias, não foram considerados como perda de expressão nas peças operatória para os cálculos estatísticos, o que reduziu o número de casos. Como resultados observou-se que a queda da expressão forte ($\geq 75\%$ de células positivas) vs. valores menores que 75% era estatisticamente significativas ($p=0,007$), nas amostras pareadas, mesmo excluindo-se os casos com 0% de células viáveis nas amostras de peças operatórias. Portanto, é evidente que há uma queda ou perda da expressão nuclear do SMAD4 entre biópsia e peça cirúrgica com significância estatística. Fato intrigante, dentro dessa linha de raciocínio foi perceber que não houve aumento na marcação do SMAD4 no citoplasma, o que poderia ser esperado.

Achados parecidos ocorreram com relação ao TGF β , mas de modo não pareado, onde houve uma queda significativa de expressão entre biópsias (sem tratamento prévio) quando comparadas com as peças operatórias (pós-tratamento com QT). Esses dados podem sugerir que haja alteração na expressão dessas proteínas entre biópsias e peças operatórias, após exposição a uma das drogas utilizadas (Doxorrubicina ou Ifosfamida). Dados semelhantes já foram mostrados em outros tumores, como em casos

de carcinoma de mama, por exemplo (DI LEO et al. 2001; GE RONGRONG et al. 2006).

Observou-se também, que a queda ou ausência de expressão da marcação do SMAD4 nuclear, nas peças operatórias, associaram-se a melhores taxas de SLRD. Para pacientes com expressão positiva verificou-se 46,8% de SLRD em 5 anos, enquanto 66,7% dos pacientes, sem expressão dessa proteína nas amostras de espécimes cirúrgicos, se apresentaram livre de doença em 5 anos. Comparando com a literatura, para pacientes portadores de CEC de esôfago, a elevada expressão de SMAD4 em amostras de biópsias pré-tratamento com RT e QT foi relacionada com maiores taxas de resposta patológica e melhores índices de sobrevida ($P < 0,0001$) (BRÜCHER et al. 2007). Sabendo-se que a via mediada por TGF β é ambígua em relação à supressão ou à promoção tumoral, que em fases iniciais da doença é supressora e em fases tardias ela estimula fenômenos de proliferação e metástase, a perda de sua ativação, representada pela queda da expressão do SMAD4 no núcleo das células tumorais, hipoteticamente, devida à ação da QT, pode estar relacionada a menores taxas de recaída sistêmica. Apesar disso, não houve relação entre a expressão tanto do SMAD4 quanto do próprio TGF β com a percentagem de células viáveis nas peças operatórias, ou seja, com resposta patológica, significativa.

Avaliando a expressão das proteínas FST e Id1 nas amostras de biópsia pré-tratamento, também não se observou relação entre a positividade ou negatividade e resposta patológica. Numa análise de

sobrevida, tendo em vista que a proteína Id1, quando expressa, bloqueia fenômenos de diferenciação celular, observou-se uma evolução pior para os pacientes sem aumento da expressão dessa proteína, quando expostos a QT. Faz sentido que isso ocorra, tendo em vista que células mais indiferenciadas se reproduzem mais rapidamente, o que as tornam mais susceptíveis à ação da QT. Mesmo sem significância estatística, 100% dos pacientes com expressão positiva de Id1 em amostras de biópsia estão vivos em uma estimativa de 5 anos, quando comparados com 67,9% dos pacientes com expressão negativa dessa proteína. A comparação entre a expressão dos marcadores avaliados com dados de sobrevida não é o objetivo deste estudo, apesar de se encontrarem resultados interessantes que devem ser melhor compreendidos e analisados posteriormente.

6.3 RESPOSTA CLÍNICA

Foram utilizados como critérios de avaliação de resposta ao tratamento pré-operatório aqueles padronizados pelo RECIST (THERASSE et al. 2000), tendo em vista tratar-se de um método de simples execução e interpretação. A principal limitação desse método é o fato de ele ser unidimensional, quanto à avaliação da lesão principal, porque a resposta tumoral pode ser não dimensional, especialmente em fases precoces de tratamento (WAHL et al. 2009). Nesses pacientes a resposta tumoral se dá, muitas vezes, por alterações metabólicas e de características radiológicas, como surgimento de áreas císticas com áreas de densidades diferentes da

inicial (pré-tratamento). Mesmo se sabendo dessas limitações em sua aplicação, os critérios RECIST ainda são um dos mais utilizados nos ensaios clínicos para mensurar resposta clínica a tratamento em tumores sólidos (WAHL et al. 2009).

Tentando solucionar essa limitação do RECIST tem surgido na literatura a adaptação de métodos de imagem para avaliação de resposta a tratamento em tumores sólidos. A partir de imagens de TC, esses critérios foram inicialmente utilizados para avaliar resposta em GIST's após tratamento com Imatinibe, e foram validados como preditores de sobrevida (CHOI et al. 2007; BENJAMIN et al. 2007). Em 2009 foi publicado um estudo piloto comparando RECIST vs. Critérios de choi para avaliação de resposta em sarcomas. Nesta série de 38 pacientes houve correlação entre os Critérios de choi com resposta patológica, sobrevida global e livre de progressão (STACCHIOTTI et al. 2009; GRONCHI et al. 2012). Um estudo mais recente com 243 pacientes com sarcoma de alto grau, que receberam terapia neoadjuvante, mostrou a mesma superioridade dos Critérios de Choi, também, com significância na Sobrevida Global e Livre de Progressão, principalmente nos pacientes que receberam QT isoladamente (STACCHIOTTI et al. 2012).

O uso de métodos metabólico/quantitativos vem se tornando mais comum na avaliação de resposta a tratamentos neoadjuvantes em oncologia. Nesse cenário, de avaliação de resposta a diversos tipos de tratamento para vários tipos de tumores, tem-se o PET_CT (Tomografia por Emissão de Pósitrons) (JUWEID e CHESON 2006). Para SPM foi mostrado,

em 2008, que mudanças de captação do FDG (18F-fluorodeoxyglicose), a partir de uma linha de base, após tratamento neoadjuvante, foram mais fidedignas do que as alterações no tamanho, baseadas em imagem de TC pré e pós-tratamento, diferenciando pacientes respondedores (EVILEVITCH et al. 2008). Em 2009, o mesmo grupo publicou um estudo prospectivo em que foram avaliadas alterações do ganho de FDG, após um primeiro ciclo de QT e ao final do tratamento, em uma tentativa de diferenciar precocemente, pacientes respondedores dos não respondedores. Oito pacientes (16%) foram considerados respondedores após o primeiro ciclo de QT, com redução de captação de 35% no tumor. A sensibilidade e especificidade foram de 100% e 67%, respectivamente (BENZ et al. 2009).

No presente trabalho observou-se muitas vezes, mesmo não sendo notada regressão maior que 30% no maior diâmetro do tumor, uma melhora clínica significativa, traduzida tanto pelo relato de melhora de sintomas como por mudança das características à palpação, exemplificada pela maior mobilidade do tumor em relação aos planos profundos ou por verificar uma consistência mais cística. Apesar de muitos estudos que usaram radioquimioterapia como terapia pré-operatória, publicarem taxas de resposta clínica que oscilaram entre 26% e 30% (PISTERS 1998; PISTERS et al. 2007; RODRIGO et al. 2011), essa resposta não teve correlação com a percentagem de células viáveis na peça operatória, o que está de acordo com os dados de literatura anteriormente citados. Surpreendentemente, no atual estudo, apesar de não significativa, observou-se uma diferença importante entre os pacientes com resposta parcial vs. progressão de

doença ao RECIST, tanto em SG quanto em SLRD. Ainda mais, avaliando resposta patológica, os pacientes com resposta parcial clínica tiveram menor percentagem de células viáveis na peça operatória, quando comparados com os pacientes que tiveram progressão de doença, inclusive com significância estatística para o ponto de corte de 30%.

Mesmo com tantas críticas, acredita-se que os critérios RECIST devem permanecer válidos ainda por alguns anos, em razão de sua fácil aplicabilidade em qualquer centro e do baixo custo (BURTON 2007).

6.4 QUIMIOTERAPIA E TOXICIDADE

Diante do pressuposto de que a radioterapia tem papel exclusivo no controle local, sem influência em termos de controle da doença micrometastática, e que a QT atua em ambos os cenários e supondo que os índices de resposta com utilização exclusiva de QT neoadjuvante mostram significativos, poder-se-ia adiar a utilização da RT aplicando-a como modalidade adjuvante, diminuindo, assim, complicações de ferida operatória e possibilitando a utilização de QT na maioria dos pacientes. Esta abordagem tem algumas vantagens, como a de permitir o uso de esquemas combinados de drogas em doses mais altas, tendo em vista que são pouco toleradas quando concomitantes à RT. Com o argumento de controle precoce de doença micrometastática e diminuição de taxas de complicação de ferida operatória, uma vez que o uso de radioterapia neoadjuvante danifica os tecidos sãos peritumorais e dificulta a cicatrização, a

quimioterapia neoadjuvante tem sido utilizada na terapia dos sarcomas (PISTERS et al. 2007).

Este estudo, todos os pacientes foram avaliados três semanas após o término de cada ciclo e cerca de uma semana antes do ciclo seguinte. Nessa ocasião, além da realização de exames laboratoriais, realizava-se um exame físico atencioso. Percebeu-se que, em muitos casos, o tumor se tornava mais móvel ou menor. Apesar de ser uma avaliação subjetiva, este fato já foi relatado em alguns estudos (MENENDEZ et al. 2007). Essa observação é animadora do ponto de vista técnico, tendo em vista a maior facilidade prevista pelo exame na ressecabilidade da lesão.

Utilizou-se um esquema de QT com duas drogas: Ifosfamida na dose de 1,8 – 2,0mg/m² (total de 9-10g/m²); e doxorrubicina na dose total de 60mg/m². Houve apenas um óbito com esse esquema. Este óbito foi de uma paciente idosa com 84 anos de idade, após o primeiro ciclo da quimioterapia, logo no início do protocolo. Após esse fato, reduziu-se a idade superior limítrofe, para entrar no protocolo, a 75 anos, e não houve mais nenhum óbito relacionado à quimioterapia e suas complicações. Um paciente apresentou hemorragia intratumoral grave na vigência de anticoagulação. Tratava-se de um paciente com grande tumor em cintura pélvica, associado à trombose da veia ilíaca externa por envolvimento tumoral. Atribuiu-se este óbito à complicação diretamente relacionada à progressão tumoral e não ao tratamento.

Apesar da dose relativamente baixa de doxorrubicina em relação aos esquemas propostos na literatura, a baixa taxa de óbito e complicações

graves associada a resposta satisfatória permitiu manter essa dose. Além disso, dados de uma publicação nacional prévia mostrou que doses mais altas de doxorubicina não aumentaram os índices de SG em pacientes com sarcomas (ALMEIDA et al. 2011), com aumento apenas em morbimortalidade.

Além disso, esse esquema possibilitou que quase 80% dos pacientes recebessem 3 ou 4 ciclos de quimioterapia. Cálculos de sobrevida entre os pacientes que fizeram 3 ou quatro ciclos deste estudo não mostraram diferença de sobrevida. Na introdução desta tese mostra-se um estudo que comparou 3 vs 5 ciclos de quimioterapia e que, também, não demonstrou ganho de sobrevida com um maior número de ciclos de QT. Parece que a realização de 3 ciclos é suficiente para esse tipo de abordagem em pacientes com SPM de alto grau em extremidades (ALMEIDA et al. 2011). Dos pacientes que receberam apenas dois ciclos (n=7), 6 receberam só essa quantidade por progressão de doença local, enquanto dos 12 pacientes que receberam três ciclos de QT, apenas um suspendeu o quarto ciclo por progressão de doença.

Uma crítica atual sobre o uso de QT em sarcomas reside no fato de que os diferentes tipos histológicos respondem melhor a diferentes tipos de drogas. Em uma análise multivariada da publicação do ISS, o subtipo histológico foi associado à diferença na sobrevida. Em particular, o leiomiossarcoma teve o pior prognóstico (GRONCHI et al. 2012) neste estudo. Ante essa diversidade de subtipos histológicos; várias pesquisas, no campo da terapia em sarcomas têm investigado a ação de diferentes drogas

e terapias-alvo com ação mais efetiva. Contudo, mesmo se sabendo da existência dessa atividade antitumoral específica, como é o caso da gencitabina para leiomiossarcoma (MAKI et al. 2007), a trabecitidina contra lipossarcoma e leiomiossarcoma (GROSSO et al. 2007), e a associação de gencitabina e taxanos para angiossarcoma (PENEL et al. 2008), a grande maioria dos estudos mantém a QT baseada em doxorubicina como padrão para o tratamento de sarcoma de alto risco em todos os cenários clínicos.

6.5 ASPECTOS CIRÚRGICOS

Um dos resultados que mais chamam a atenção neste estudo são a frequência e o padrão de complicações pós-operatórias relacionadas à ferida operatória (22,5% com QT exclusiva vs. 41,8% com radioquimioterapia em nosso serviço). Entre os 40 pacientes operados, ocorreram seis deiscências parciais e superficiais de ferida, sendo duas delas secundárias à infecção local. Houve um caso de sangramento pós-operatório, que levou a uma reoperação no primeiro dia pós-operatório; e dois casos que evoluíram com seroma que foram resolvidos com punção. As deiscências se resolveram em poucas semanas com cuidados locais e uso de antibióticos em tempo hábil para não alterar o planejamento e a realização de radioterapia pós-operatória, prevista no protocolo. Essas complicações relatadas não atrasaram em nada o planejamento de tratamento adjuvante tanto rádio quanto quimioterápico.

Por outro lado, as complicações em ferida observadas entre os pacientes submetidos à radioquimioterapia pré-operatória se caracterizaram por extensas deiscências, associadas à necrose de retalhos, com necessidade de várias intervenções para desbridamento de tecidos desvitalizados (AGUIAR JR et al. 2009). Como consequência dessas complicações, 14 de 19 pacientes (74%), que teriam indicação de QT adjuvante, sofreram mudanças no plano terapêutico. Alguns serviços têm mostrado boas evoluções quanto à ferida operatória, com emprego de técnicas de reconstrução mais complexas, como retalhos microcirúrgicos, apesar da radioterapia prévia (TSENG et al. 2006; TEMPLE et al. 2007). No presente trabalho todos os casos foram reconstruídos com retalhos fásccio ou miocutâneos simples, com manutenção de baixas taxas de complicação de feridas.

Neste trabalho, 37 pacientes (92,5%) foram submetidos a uma ressecção R0 com preservação do membro. Apenas 3 pacientes (7,5%) foram submetidos à amputação, dentre eles, um caso foi considerado passível de ressecção com preservação do membro, na avaliação inicial pela RM (antes da neoadjuvância). Esse paciente vinha com doença estável em exames de controle na vigência da quimioterapia, mas, após o terceiro ciclo, houve uma progressão considerável que, mesmo o paciente recebendo os 4 ciclos previstos, impossibilitou a preservação do membro com margens adequadas. Esse caso representa apenas 2,5% da amostra, o que é um ganho importante em relação ao nosso resultado com radioquimioterapia, onde houve 14,3% de amputações (AGUIAR JR et al. 2009). Um outro caso de amputação foi de um paciente com recidiva em

uma lesão de mão que, anatomicamente é um local muito difícil de ser preservado.

A amputação como modalidade de tratamento em sarcomas de extremidades vem decrescendo com o avanço do tratamento multidisciplinar. Seu papel vem se limitando a casos inicialmente muito avançados, como palição, ou para casos de recidiva onde a cirurgia preservadora não é mais possível. Nessa situação a amputação não traz ganho de sobrevida global, mas mostra menores taxas de recorrência local na grande maioria dos casos (STOJADINOVIC et al. 2001).

Um dos receios que se tinha com o esquema de QT pré-operatória era o de aumentar as taxas de amputação, no entanto houve taxas menores quando comparados com a própria experiência prévia do nosso grupo, quando usados RT e QT neoadjuvante (AGUIAR JR et al. 2009). Um outro estudo pequeno, também com o uso de RT e QT neoadjuvante, mostrou taxas de preservação de membro de 91% (20/22 pacientes), e 2 pacientes amputados eram candidatos à cirurgia preservadora de membro no início do protocolo (RYAN et al. 2008).

Outras publicações que usaram esquemas de RT e QT neoadjuvante mostraram taxas de amputação que variaram de 7% a 16% (CURTIS et al. 2011). GRONCHI et al. (2012) mostrou uma taxa de amputação de 10% com 3 ciclos de QT neoadjuvante exclusiva, baseadas em doxorubicina e ifosfamida.

Como foi dito anteriormente, um dos objetivos da terapia neoadjuvante é o de “esterilizar” as margens da lesão. Isso permite ao

cirurgião ressecções mais conservadores, principalmente, diante da proximidade dos tumores com vasos ou nervos. No entanto microscopicamente as margens da lesão são tidas como exíguas, mas livres. A avaliação anatomopatológica dos espécimes cirúrgicos revelou margens microscópicas livres em 36 dos 40 pacientes operados. Destas, 10 foram exíguas. Não houve correlação entre dados de sobrevida quando comparados pacientes com margens livres exíguas vs amplas, o que confirma a observação descrita anteriormente.

Houve também apenas três pacientes que apresentaram recidiva local. Importante notar que todos os três pacientes eram portadores de doença metastática ao diagnóstico. Todos eles foram submetidos à cirurgia com ressecção marginal inclusive com um deles tendo margem microscópica comprometida na peça cirúrgica. É natural que o cirurgião seja mais conservador em ressecção de lesões em doentes metastáticos. Sabe-se que o desfecho clínico será dado pela própria doença à distância, o que desencoraja amputações e estimula os cirurgiões a insistirem em táticas mais conservadoras em função da perspectiva de sobrevida curta. Portanto, pode-se afirmar que o esquema proposto é seguro no sentido de não aumentar taxas de amputação.

Um outro dado que causava preocupação era o provável risco de aumento nas taxas de suspensão de cirurgia, decorrente de complicações relacionadas ao próprio tratamento, ou de progressão da doença na vigência de um esquema relativamente longo de neoadjuvância. Houve apenas um caso em que ocorreu esse fato (2,5%), o que confirma a segurança do esquema proposto.

7 CONCLUSÕES

Não houve correlação estatisticamente significativa entre expressão das proteínas TGF β , FST, Id1 e SMAD4, entre amostras de biópsia pré-tratamento com QT e resposta patológica.

As taxas de respostas objetivas sobre o tumor primário, quanto à resposta clínica (RECIST), foi de 17,5%, e quanto à resposta patológica foi de 15%, 20% e 37,5% para valores menores ou iguais a 5%, 10% e 30% de células viáveis na amostra de tumores ressecados pós-QT pré-operatória.

A taxa de preservação de membros foi de 92,5%.

A taxa de contraindicação cirúrgica causada por complicações do tratamento ou por progressão de doença durante o tratamento pré-operatório foi de 4,7%.

No esquema proposto, as taxas de toxicidade foram de 54,7% para graus 1-2 e de 45,2%, para graus 3-4. Houve um óbito (2,3%) decorrente de toxicidade referente à QT.

O método de análise patológica, que quantificou a percentagem de células tumorais viáveis em peça operatória, de pacientes com sarcoma de extremidades submetidos à QT neoadjuvante, com doxorubicina e ifosfamida, mostrou-se confiável, de fácil aplicabilidade. Os pontos de corte adotados foram de $\leq 5\%$, $\leq 10\%$ ou $\leq 30\%$ de células viáveis tendo correlação positiva com dados de sobrevida.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts and figures 2013**. [documento da internet] 2013. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>> [2013 fev. 27].

Aguiar Jr S. **Análise do perfil de expressão gênica de sarcomas de partes moles de extremidades de adultos submetidos à quimioterapia neoadjuvante com doxorrobucina e ifosfamida**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Aguiar Jr S, Ferreira FO, Rossi BM, Santos EMM, Salvajoli JV, Lopes A. Neoadjuvant chemoradiation therapy for soft tissue sarcomas of the extremities. **Clinics** 2009; 64:1059-64.

Almeida GFG, Castro Jr G, Snitcovsky ML, et al. Sequential dose-dense doxorubicin and ifosfamide in advanced soft-tissue sarcoma patients in an out-patient-basis schedule. **Sarcoma** 2011; 2011:984340.

[Anonymous]. Adjuvant chemotherapy for localised resectable soft-tissue sarcoma of adults: meta-analysis of individual data. Sarcoma Meta-analysis Collaboration. **Lancet** 1997; 350:1647-54.

Azuma M, Motegi K, Aota K, Yamashita T, Yoshida H, Sato M. TGF-beta1 inhibits NF-kappaB activity through induction of IkappaB-alpha expression in human salivary gland cells: a possible mechanism of growth suppression by TGF-beta1. **Exp Cell Res** 1999; 250:213-22.

Bakin AV, Rinehart C, Tomlinson AK, Arteaga CL. p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. **J Cell Sci** 2002; 115(Pt 15):3193-206.

Benjamin RS, Choi H, Macapinlac HA, et al. We should desist using RECIST, at least in GIST. **J Clin Oncol** 2007; 25:1760-4.

Benz MR, Czernin J, Allen-Auerbach MS, et al. FDG-PET/CT imaging predicts histopathologic treatment responses after the initial cycle of neoadjuvant chemotherapy in high-grade soft-tissue sarcomas. **Clin Cancer Res** 2009; 15:2856-63.

Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. **Mol Biol Cell** 2001; 12:27-36.

Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:506-20.

Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. **N Engl J Med** 2000; 342:1350-8.

Bramwell VHC. Adjuvant chemotherapy for adult soft tissue sarcoma: is there a standard of care? **J Clin Oncol** 2001; 19:1235-7.

Brennan MF, Casper ES, Harrison LB, Shiu MH, Gaynor J, Hadju SI. The role of multimodality therapy in soft tissue sarcoma. **Ann Surg** 1991; 214:328-36.

Brennan MF, Singer S, Maki RG, O'Sullivan B. Sarcomas of the soft tissue and bone. In: DeVita Jr V, Lawrence TS, Rosenberg AS, editors. **DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology**. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p.1581-631.

Brücher BL, Pühringer-Oppermann F, Sarbia M. Smad4 is predictive for response in neoadjuvant treated esophageal squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2007; 25:4591A. [Presented at the ASCO Annual Meeting]

Burton A. RECIST: right time to renovate? **Eur J Cancer** 2007; 43:1642.

Chang AE, Kinsella T, Glatstein E, et al. Adjuvant chemotherapy for patients with high-grade soft-tissue sarcomas of the extremity. **J Clin Oncol** 1988; 6:1491-500.

Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, et al. Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. **J Clin Oncol** 2007; 25:1753-9.

Coindre JM, Terrier P, Guillou L, et al. Predictive value of grade for metastatic development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. **Cancer** 2001; 91:1914-26.

Corless CL, Barnett CM, Heinrich MC. Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:865-78.

Cormier JN, Huang X, Xing Y, et al. Cohort analysis of patients with localized, high-risk, extremity soft tissue sarcoma treated at two cancer centers: chemotherapy-associated outcomes. **J Clin Oncol** 2004; 22:4567-74.

Cormier JN, Pollock RE. Soft tissue sarcomas. **CA Cancer J Clin** 2004; 54:94-109.

Curtis KK, Ashman JB, Beauchamp CP, et al. Neoadjuvant chemoradiation compared to neoadjuvant radiation alone and surgery alone for Stage II and III soft tissue sarcoma of the extremities. **Radiat Oncol** 2011; 6:91.

de Kretser DM, O'Hehir RE, Hardy CL, Hedger MP. The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair. **Mol Cell Endocrinol** 2012; 359:101-6.

DeLaney TF, Spiro IJ, Suit HD, et al. Neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy for large extremity soft-tissue sarcomas. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2003; 56:1117-27.

Di Leo A, Larsimont D, Gancberg D, et al. HER-2 and topo-isomerase IIalpha as predictive markers in a population of node-positive breast cancer patients randomly treated with adjuvant CMF or epirubicin plus cyclophosphamide. **Ann Oncol** 2001; 12:1081-9.

Donahue TR, Kattan MW, Nelson SD, Tap WD, Eilber FR, Eilber FC. Evaluation of neoadjuvant therapy and histopathologic response in primary, high-grade retroperitoneal sarcomas using the sarcoma nomogram. **Cancer** 2010; 116:3883-91.

Durbecq V, Paesmans M, Cardoso F, et al. Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. **Mol Cancer Ther** 2004; 3:1207-14.

Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. **J Biol Chem** 2001; 276:12477-80.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7^a ed. New York: Springer-Verlag; 2010. Soft tissue sarcomas, 291-6.

Eilber F, Eckardt J, Rosen G, Forscher C, Selch M, Fu YS. Preoperative therapy for soft tissue sarcoma. **Hematol Oncol Clin North Am** 1995; 9:817-23.

Eilber FC, Rosen G, Eckardt J, et al. Treatment-induced pathologic necrosis: a predictor of local recurrence and survival in patients receiving neoadjuvant therapy for highgrade extremity soft tissue sarcomas. **J Clin Oncol** 2001; 19:3203-9.

Eilber FC, Rosen G, Nelson SD, et al. High-grade extremity soft tissue sarcomas: factors predictive of local recurrence and its effect on morbidity and mortality. **Ann Surg** 2003; 237:218-26.

Engel CJ, Eilber FR, Rosen G, Selch MT, Fu YS. Preoperative chemotherapy for soft tissue sarcomas of the extremities: the experience at the University of California, Los Angeles. **Cancer Treat Res** 1993; 67:135-41.

Evilevitch V, Weber WA, Tap WD, et al. Reduction of glucose metabolic activity is more accurate than change in size at predicting histopathologic response to neoadjuvant therapy in high-grade soft-tissue sarcomas. **Clin Cancer Res** 2008; 14:715-20.

Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2005; 21:659-93.

Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, Hutter RNP, Kennedy BJ, Murphy GP, O'Sullivan B, Sobin LH, Yarbro JW. **AJCC cancer staging manual**. 5^a ed. New York: Springer-Verlag; 1997. Soft tissue sarcomas, 149-56.

Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. **Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press; 2002. (World Health Organization Classification of Tumours, v. 4, IARC WHO Classification of Tumours, n° 4).

Francis P, Namløs HM, Müller C, et al. Diagnostic and prognostic gene expression signatures in 177 soft tissue sarcomas: hypoxia-induced transcription profile signifies metastatic potential. **BMC Genomics** 2007; 8:73.

Frustaci S, Gherlinzoni F, De Paoli A, et al. Adjuvant chemotherapy for adult soft tissue sarcomas of the extremities and girdles: Results of the Italian randomized cooperative trial. **J Clin Oncol** 2001; 19:1238-47.

Frustaci S, De Paoli A, Bidoli E, et al. Ifosfamide in the adjuvant therapy of soft tissue sarcomas. **Oncology** 2003; 65 Suppl 2:80-4.

Gallagher AJ, Neil JR, Schiemann WP. Role of transforming growth factor-beta in cancer progression. **Future Oncology** 2006; 2:743-63.

Genomenet. **TGF-beta signaling pathway - Homo sapiens (human)**
Available from: <URL:<http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04350.html>> [2013 mar 04].

Ge Rongrong, Rajeev V, Ray P, et al. Inhibition of growth and metastasis of mouse mammary carcinoma by selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptor kinase in vivo. **Clin Cancer Res** 2006; 12:4315-30.

Ginsberg JP, de Alava E, Ladanyi M, et al. EWS-FL11 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. **J Clin Oncol** 1999; 17:1809-14.

Gomez Abuin G, Lassalle M, Bonvalot S, et al. Intensive induction chemotherapy (API-AI regimen) followed by conservative surgery in adult patients with locally advanced soft tissue sarcoma (STS): Survival is predicted by the histological response. **J Clin Oncol** 2004; 22 (15 suppl):9036. [Presented at the ASCO Annual Meeting Proceedings].

Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. **Immunity** 2000; 12:171-81.

Gortzak E, Azzarelli A, Buesa J, et al. A randomised phase II study on neo-adjuvant chemotherapy for 'high-risk' adult soft-tissue sarcoma. **Eur J Cancer** 2001; 37:1096-103.

Grobmyer SR, Maki RG, Brennan MF, et al. Neo-adjuvant chemotherapy for primary high-grade extremity soft tissue sarcoma. **Ann Oncol** 2004; 15:1667-72.

Gronchi A, Frustaci S, Mercuri M, et al. Short, full-dose adjuvant chemotherapy in high-risk adult soft tissue sarcomas: a randomized clinical trial from the Italian Sarcoma Group and the Spanish Sarcoma Group. **J Clin Oncol** 2012; 30:850-6.

Grosso F, Jones RL, Demetri GD, et al.,: Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. **Lancet Oncol** 2007; 8:595-602.

Guillou L, Coindre JM, Bonichon F, et al. Comparative study of the National Cancer Institute and French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group grading systems in a population of 410 adult patients with soft tissue sarcoma. **J Clin Oncol** 1997; 15:350-62.

Guillou L, Benhattar J, Bonichon F, et al. Histologic grade, but not SYT-SSX fusion type, is an important prognostic factor in patients with synovial sarcoma: a multicenter, retrospective analysis. **J Clin Oncol** 2004; 22:4040-50.

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

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. **Cell** 1997; 89:1165-73.

Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:806-13.

Henshaw RM, Priebat DA, Perry DJ, Shmookler BM, Malawer MM. Survival after induction chemotherapy and surgical resection for high-grade soft tissue sarcoma. Is radiation necessary? **Ann Surg Oncol** 2001; 8:484-95.

Hoffmann AC, Danenberg KD, Taubert H, Danenberg PV, Wuerl P. A three-gene signature for outcome in soft tissue sarcoma. **Clin Cancer Res** 2009; 15:5191-8.

Huang HY, Illei PB, Zhao Z, et al. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. **J Clin Oncol** 2005; 23:548-58.

Huvos AG. **Bone tumors: diagnosis, treatment, and prognosis**. 2^a ed. Philadelphia: Saunders; 1991. p.122-8, Osteogenic sarcoma: pathologic assessment of preoperative (neoadjuvant) chemotherapy.

Israel MA, Hernandez MC, Florio M, et al. Id gene expression as a key mediator of tumor cell biology. **Cancer Res** 1999; 59(7 Suppl):1726s-1730s.

Issels RD, Abdel-Rahman S, Wendtner C, et al. Neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) for locally advanced primary or recurrent high-risk adult soft-tissue sarcomas (STS) of adults: long-term results of a phase II study. **Eur J Cancer** 2001; 37:1599-608.

Jimenez RE, Zalupski MM, Frank JJ, Du W, Ryan JR, Lucas DR. Multidrug resistance phenotype in high grade soft tissue sarcoma: correlation of P-glycoprotein immunohistochemistry with pathologic response to chemotherapy. **Cancer** 1999; 86:976-81.

Jones NB, Iwenofu H, Scharschmidt T, Kraybill W. Prognostic factors and staging for soft tissue sarcomas: an update. **Surg Oncol Clin N Am** 2012; 21:187-200.

Juweid ME, Cheson BD. Positron-emission tomography and assessment of cancer therapy. **N Engl J Med** 2006; 354:496-507.

Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. **Mol Cell** 2000; 6:1365-75.

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **TGF-beta signaling pathway - Homo sapiens (human)**. Available from: <URL:<http://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04350.html>> [2013 fev 04]

Kelly KM, Womer RB, Sorensen PH, Xiong QB, Barr FG. Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. **J Clin Oncol** 1997; 15:1831-6.

Khanfir K, Alzieu L, Terrier P, et al. Does adjuvant radiation therapy increase loco-regional control after optimal resection of soft-tissue sarcoma of the extremities? **Eur J Cancer** 2003; 39:1872-80.

Koea JB, Leung D, Lewis JJ, Brennan MF. Histopathologic type: an independent prognostic factor in primary soft tissue sarcoma of the extremity? **Ann Surg Oncol** 2003; 10:432-40.

Kraybill WG, Harris J, Spiro IJ, et al. Phase II study of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the management of high-risk, high-grade, soft tissue sarcomas of the extremities and body wall: Radiation Therapy Oncology Group Trial 9514. **J Clin Oncol** 2006; 24:619-25.

Ladanyi M, Antonescu CR, Leung DH, et al. Impact of SYT-SSX fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective study of 243 patients. **Cancer Res** 2002; 62:135-40.

Lamouille S, Derynck R. Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. **J Cell Biol** 2007; 178:437-51.

Lasorella A, Uo T, Iavarone A. Id proteins at the cross-road of development and cancer. **Oncogene** 2001; 20:8326-33.

Li X, Nie F, Yin Z, He J. Enhanced hyperplasia in muscles of transgenic zebrafish expressing Follistatin1. **Sci China Life Sci** 2011; 54:159-65.

Lindberg RD, Martin RG, Romsdahl MM, Barkley HT Jr. Conservative surgery and postoperative radiotherapy in 300 adults with soft tissue sarcomas. **Cancer** 1981; 47:2391-7.

Lopes A, Nakagawa WT, Ferreira FO. Princípios da cirurgia e planejamento terapêutico. In: Lopes A, editor. **Sarcomas de partes moles**. Rio de Janeiro: Medsi; 1999. p.113-27.

Lyden D, Young AZ, Zagzag D, et al. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. **Nature** 1999; 401:670-7.

Maki RG, Wathen JK, Patel SR, et al. Randomized phase II study of gemcitabine and docetaxel compared with gemcitabine alone in patients with metastatic soft tissue sarcomas: results of sarcoma alliance for research through collaboration study 002 [corrected]. **J Clin Oncol** 2007; 25:2755-63.

Man TK, Chintagumpala M, Visvanathan J, et al. Expression profiles of osteosarcoma that can predict response to chemotherapy. **Cancer Res** 2005; 65:8142-50.

Matsumine A, Shintani K, Kusuzaki K, et al. Expression of decorin, a small leucine-rich proteoglycan, as a prognostic factor in soft tissue tumors. **J Surg Oncol** 2007; 96:411-8.

Menendez LR, Ahlmann ER, Savage K, Cluck M, Fedenko AN. Tumor necrosis has no prognostic value in neoadjuvant chemotherapy for soft tissue sarcoma. **Clin Orthop Relat Res** 2007; 455:219-24.

Merimsky O, Issakov J, Bickels J, et al. ErbB-4 expression in limb soft-tissue sarcoma: correlation with the results of neoadjuvant chemotherapy. **Eur J Cancer** 2002; 38:1335-42.

Mintz MB, Sowers R, Brown KM, et al. An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. **Cancer Res** 2005; 65:1748-54.

Miyazono K, Miyazawa K. Id: a target of BMP signaling. **Sci STKE** 2002; 2002:pe40.

Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. **J Cell Sci** 2005; 118(Pt 16):3573-84.

Nakamura T, Sugino K, Titani K, Sugino H. Follistatin, an activin-binding protein, associates with heparan sulfate chains of proteoglycans on follicular granulosa cells. **J Biol Chem** 1991; 266:19432-7.

Nakao A, Afrakhte M, Morén A, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. **Nature** 1997; 389:631-5.

O'Sullivan B, Davis AM, Turcotte R, et al. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. **Lancet** 2002; 359:2235-41.

Ochi K, Daigo Y, Katagiri T, et al. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma by gene-expression profiles. **Int J Oncol** 2004; 24:647-55.

Oliveira AM, Fletcher CDM. Molecular prognostication for soft tissue sarcomas: are we ready yet? **J Clin Oncol** 2004; 22:4031-4.

Ottaiano A, De Chiara A, Fazioli F, et al. Biological prognostic factors in adult soft tissue sarcomas. **Anticancer Res** 2005; 25:4519-26.

Paik S, Bryant J, Tan-Chiu E, et al. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:1991-8.

Penel N, Bui BN, Bay JO, et al. Phase II trial of weekly paclitaxel for unresectable angiosarcoma: the ANGIOTAX Study. **J Clin Oncol** 2008; 26:5269-74.

Pervaiz N, Colterjohn N, Farrokhyar F, Tozer R, Figueredo A, Ghert M. A systematic meta-analysis of randomized controlled trials of adjuvant chemotherapy for localized resectable soft-tissue sarcoma. **Cancer** 2008; 113:573-81.

Phillips DJ, Jones KL, McGaw DJ, et al. Release of activin and follistatin during cardiovascular procedures is largely due to heparin administration. **J Clin Endocrinol Metab** 2000; 85:2411-5.

Pinedo HM, Vendrik CP, Bramwell VH, et al. Evaluation of adjuvant therapy in soft tissue sarcoma. A collaborative multidisciplinary approach. E.O.R.T.C. protocol 62771. **Eur J Cancer** 1979; 15:811-20.

Pisters PWT. Combined modality treatment of extremity soft tissue sarcomas. **Ann Surg Oncol** 1998; 5:464-72.

Pisters PWT. Chemoradiation treatment strategies for localized sarcoma: conventional and investigational approaches. **Semin Surg Oncol** 1999; 17:66-71.

Pisters PW, Ballo MT, Patel SR. Preoperative chemoradiation treatment strategies for localized sarcoma. **Ann Surg Oncol** 2002; 9:535-42.

Pisters PWT. Preoperative chemotherapy and split-course radiation therapy for localized soft tissue sarcomas: home run, base hit, or strike out? **J Clin Oncol** 2006; 24:549-51.

Pisters PW, O'Sullivan B, Maki RG. Evidence-based recommendations for local therapy for soft tissue sarcomas. **J Clin Oncol** 2007; 25:1003-8.

Reynoso D, Subbiah V, Trent JC, et al. Neoadjuvant treatment of soft-tissue sarcoma: a multimodality approach. **J Surg Oncol** 2010; 101:327-33.

Rodino-Klapac LR, Haidet AM, Kota J, Handy C, Kaspar BK, Mendell JR. Inhibition of myostatin with emphasis on follistatin as a therapy for muscle disease. **Muscle Nerve** 2009; 39:283-96.

Rodrigo RS, Nathalie A, Elodie T, et al. Topoisomerase II-alpha protein expression and histological response following doxorubicin-based induction chemotherapy predict survival of locally advanced soft tissues sarcomas. **Eur J Cancer** 2011; 47:1319-27.

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

Rosenberg SA, Tepper J, Glatstein E, et al. The treatment of soft-tissue sarcomas of the extremities: prospective randomized evaluations of (1) limb-sparing surgery plus radiation therapy compared with amputation and (2) the role of adjuvant chemotherapy. **Ann Surg** 1982; 196:305-15.

Ryan CW, Montag AG, Hosenpud JR, et al., Histologic response of dose-intense chemotherapy with preoperative hypofractionated radiotherapy for patients with high-risk soft tissue sarcomas. **Cancer** 2008; 112:2432-9.

Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell** 2003; 113:685-700.

Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S, Ryu B, Alani RM. Id proteins in cell growth and tumorigenesis. **Cancer Cell** 2003; 3:525-30.

Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. **J Clin Oncol** 2002; 20:2672-9.

Souchelnytskyi S, Nakayama T, Nakao A, et al. Physical and functional interaction of murine and Xenopus Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. **J Biol Chem** 1998; 273:25364-70.

Stacchiotti S, Collini P, Messina A, et al. High-grade soft-tissue sarcomas: tumor response assessment--pilot study to assess the correlation between radiologic and pathologic response by using RECIST and Choi criteria. **Radiology** 2009; 251:447-56.

Stacchiotti S, Verderio P, Messina A, et al. Tumor response assessment by modified Choi criteria in localized high-risk soft tissue sarcoma treated with chemotherapy. **Cancer** 2012; 118:5857-66.

Stockwin LH, Vistica DT, Kenney S, et al. Gene expression profiling of alveolar soft-part sarcoma (ASPS). **BMC Cancer** 2009; 9:22.

Stojadinovic A, Jaques DP, Leung DH, Healey JH, Brennan MF. Amputation for recurrent soft tissue sarcoma of the extremity: indications and outcome. **Ann Surg Oncol** 2001; 8:509-18.

Temple CL, Ross DC, Magi E, DiFrancesco LM, Kurien E, Temple WJ. Preoperative chemoradiation and flap reconstruction provide high local control and low wound complication rates for patients undergoing limb salvage surgery for upper extremity tumors. **J Surg Oncol** 2007; 95:135-41.

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:205-16.

Tian M, Neil JR, Schiemann WP. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. **Cell Signal** 2011; 23:951-62.

Tseng JF, Ballo MT, Langstein HN, et al. The effect of preoperative radiotherapy and reconstructive surgery on wound complications after resection of extremity soft-tissue sarcomas. **Ann Surg Oncol** 2006; 13:1209-15.

Yang G, Yang X. Smad4-mediated TGF-beta signaling in tumorigenesis. **Int J Biol Sci** 2010; 6:1-8.

Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA. From RECIST to PERCIST: Evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. **J Nucl Med** 2009; 50 Suppl 1:122S-50S.

Waite KA, Eng C. From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. **Nat Rev Genet** 2003; 4:763-73.

Wang H, Yang GH, Bu H, et al. Systematic analysis of the TGF β /Smad signaling pathway in the rhabdomyosarcoma cell line. **Int J Exp Pathol** 2003; 84:153-63.

Weitz J, Antonescu CR, Brennan MF. Localized extremity soft tissue sarcoma: improved knowledge with unchanged survival over time. **J Clin Oncol** 2003; 21:2719-25.

Woll PJ, van Glabbeke M, Hohenberger P, et al. Adjuvant chemotherapy (CT) with doxorubicin and ifosfamide in resected soft tissue sarcoma (STS): Interim analysis of a randomised phase III trial. **J Clin Oncol** 2007; 25(Pt 1 20 suppl):1008. [Presented at the ASCO Annual Meeting Proceedings].

Wunder JS, Paulian G, Huvos AG, Heller G, Meyers PA, Healey JH. The histological response to chemotherapy as a predictor of the oncological outcome of operative treatment of Ewing sarcoma. **J Bone Joint Surg Am** 1998; 80:1020-33.

Zagars GK, Ballo MT, Pisters PW, et al. Prognostic factors for patients with localized soft-tissue sarcoma treated with conservation surgery and radiation therapy: an analysis of 1225 patients. **Cancer** 2003; 97:2530-43.

Zucman J, Delattre O, Desmaze C, et al. Cloning and characterization of the Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma t(11;22) translocation breakpoints. **Genes Chromosomes Cancer** 1992; 5:271-7.

Anexo 1 - Protocolo – Laudo de Anatomia Patológica Sarcomas/Partes moles (Biópsia)

Instituição de Origem: _____

Patologista: _____

Paciente: _____ n° AP _____

Idade: _____ Sexo: _____

Localização: _____

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

Tipo histológico: _____

Grau histológico: _____

Grau de diferenciação: _____

Índice mitótico: _____

Necrose: _____

Biópsia(s) anterior(es):

Imunoistoquímica diagnóstica (biópsia):

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

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

Anexo 2 – Ficha para coleta de dados

Protocolo para sarcomas de partes moles de extremidades de alto grau

Dados pessoais		
1. Número no estudo		
2. RG no hospital		
3. Nome		
4. Procedência	(1) região Norte, área metropolitana (2) região Norte, zona rural (3) região NE, área metropolitana (4) região NE, zona rural (5) região Centro-oeste, área metropolitana (6) região Centro-oeste, zona rural (7) região SE, área metropolitana (8) região SE, zona rural (9) região Sul, área metropolitana (10) região Sul, zona rural	
5. Telefone para contato		
6. Idade à admissão		
7. Sexo	(1) masculino (2) feminino	
8. Raça	(1) pardo (2) negro (3) branco (4) amarelo (5) indígena	
Dados clínicos pré-tratamento		
9. Sintomas e sinais	(0) nenhum (1) tumor (2) dor local (3) limitação funcional (4) dor irradiada (compressão de nervo) (5) déficit motor (neurológico) (9) outros	
10. Topografia da lesão	(1) membro inferior (2) membro superior (3) cintura pélvica (4) cintura escapular	
11. Tamanho do maior diâmetro ao exame físico		
12. Características à palpação	(0) não palpável (1) tumor móvel em relação ao plano ósseo e à pele (2) tumor fixo em relação ao plano ósseo (3) infiltra a pele (4) pulso arterial distal diminuído	
13. Manipulação prévia	(0) nenhuma (1) biópsia incisional (2) biópsia com agulha (3) ressecção recente (5) tumor recidivado (ressecção há mais de três meses)	
14. Índice de Karnofsky		
15. Comorbidades	(0) nenhuma (1) hipertensão arterial (2) diabete (3) insuficiência cardíaca (4) insuficiência coronariana (5) tabagismo (6) etilismo (7) obesidade (8) insuficiência vascular periférica (9) colagenose (10) outras	
16. Hb		
17. Ht		
18. Leucócitos		
19. Granulócitos		
20. Plaquetas		

21. Uréia		
22. Creatinina		
23. TGO		
24. TGP		
25. Fosfatase alcalina		
26. Bilirrubinas totais		
27. Fração de ejeção		
Dados radiológicos pré-tratamento		
28. Tipo de exame	(1) TC (2) RNM	
29. Tamanho (maior diâmetro)		
30. Relação com estruturas adjacentes	(0) tumor restrito ao compartimento muscular (1) desloca feixe vascular e/ou nervoso (2) envolve/abraça/infiltra um feixe vascular e/ou nervoso (3) adjacente a ou infiltra plano ósseo	
31. Estadiamento T	(1) T1a (2) T2a (3) T1b (4) T2b	
Dados anatomopatológicos pré-tratamento		
Número do exame:		
32. Tipo de biópsia	(1) incisional (2) agulha grossa ("tru cut")	
33. Tipo histológico		
34. Grau histológico	(1) baixo grau (2) grau intermediário (3) alto grau	
35. Estadiamento agrupado AJCC		
Dados do tratamento de indução (1º ciclo)		
36. Data de início		
37. Náuseas	(0) nenhuma (1) ingestão razoável (2) ingestão significativamente diminuída (3) sem ingestão oral	
38. Vômitos	(0) ausente (1) 1 episódio em 24 hs (2) 2-5 episódios em 24 hs (3) 6-10 episódios em 24 hs (4) > 10 episódios em 24 hs / necessidade de suporte parenteral	
39. Diarréia	(0) nenhuma (1) aumento 2-3 evacuações/dia em relação ao pré-tratamento (2) aumento de 4-6 evacuações/dia ou evacuações noturnas ou cólicas moderada (3) aumento de 7-9 evacuações/dia ou incontinência ou cólicas severas (4) aumento ≥ 10 evacuações/dia ou diarréia com sangue ou necessidade de suporte parenteral	
40. Estomatite	(0) nenhuma (1) úlceras indolores, eritemas ou inflamação leve (2) eritema, edema ou úlcera dolorosos, mas pode comer (3) eritema, edema ou úlcera dolorosos e não pode comer (4) exige suporte enteral ou parenteral	
41. Bilirrubina	(0) DLN* (1) não marcar (2) 1,5 x N** (3) 1,5 – 3,0 x N (4) > 3,0 x N	
42. TGO	(0) DLN (1) ≤ 2,5 x N (2) 2,6 - 5 x N (3) 5,1 - 20 x N (4) > 20 x N	
43. TGP	(0) DLN (1) ≤ 2,5 x N (2) 2,6 - 5 x N (3) 5,1 - 20 x N (4) > 20 x N	

44. Fosf. Alcalina	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
45. Hb (g/100 ml)	(0) DLN (1) $10,0 - N$ (2) $8,0 - 9,9$ (3) $6,5 - 7,9$ (4) $< 6,5$	
46. Leucócitos (x 1000/mm³)	(0) $\geq 4,0$ (1) $3,0 - 3,9$ (2) $2,0 - 2,9$ (3) $1,0 - 1,9$ (4) $< 1,0$	
47. Granulócitos (x 1000/mm³)	(0) $\geq 2,0$ (1) $1,5 - 1,9$ (2) $1,0 - 1,4$ (3) $0,5 - 0,9$ (4) $< 0,5$	
48. Plaquetas (x 1000/mm³)	(0) DLN (1) $75 - N$ (2) $50 - 74,9$ (3) $25 - 49,9$ (4) < 25	
49. Hemorragia (clínica)	(0) nenhuma (1) leve, sem transfusão (2) grande; 1-2 unidades de transfusão por episódio (3) grande; 3-4 unidades de transfusão por episódio (4) maciça, > 4 unidades de transfusão por episódio	
50. Toxicidade pulmonar	(0) nenhuma (1) assintomático, com alteração ao teste de função pulmonar (2) dispnéia sob esforço (3) dispnéia sob nível normal de atividade (4) dispnéia em repouso	
51. Toxicidade cutânea	(0) ausente (1) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema assintomáticos (2) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema com prurido ou outros sintomas associados (3) máculas, pápulas ou erupções vesiculares sintomáticas generalizadas (4) dermatite esfoliativa ou ulcerativa	
52. Alopecia	(0) sem queda (1) perda leve (2) queda pronunciada ou total	
53. Infecção	(0) ausente (1) leve (2) moderada (3) grave (4) risco de vida	
54. Creatinina	(0) DLN (1) $< 1,5 \times N$ (2) $1,5 - 3,0 \times N$ (3) $3,1 - 6,0 \times N$ (4) $> 6,0 \times N$	
55. Hematúria	(0) negativo (1) somente microscópica (2) macroscópica, sem coágulos (3) com coágulos (4) requer transfusão	
56. Toxicidade cardíaca (função)	(0) ausente (1) assintomático, declínio da FE em repouso em menos de 20% do valor basal (2) assintomático, declínio da FE em repouso em mais de 20% do valor basal (3) ICC leve, responsiva a terapia (4) ICC grave ou refratária	
57. Toxicidade cardíaca (arritmias)	(0) ausente (1) assintomático, transitória ou sem necessidade de terapia (2) recorrente ou persistente, sem necessidade de terapia (3) requer tratamento (4) requer monitorização ou hipotensão ou taquicardia ou fibrilação ventricular	

58. Toxicidade cardíaca (pericárdio)	(0) ausente (1) efusão assintomática, não requer transfusão (2) pericardite (atrato, dor torácica e alterações no ECG) (3) requer drenagem (4) tamponamento cardíaco	
59. Neurotoxicidade (sensorial)	(0) ausente (1) parestesias leves (2) perda sensorial objetiva leve a moderada (3) perda sensorial objetiva grave ou parestesias que interferem com a função	
60. Alívio de sintomas (relacionados ao tumor)	(0) não (1) sim	
61. Tamanho ao exame físico (maior diâmetro)		
2º ciclo		
Caso este ciclo seja suspenso, vá para o item 140		
62. Data do início		
63. Náuseas	(0) nenhuma (1) ingestão razoável (2) ingestão significativamente diminuída (3) sem ingestão oral	
64. Vômitos	(0) ausente (1) 1 episódio em 24 hs (2) 2-5 episódios em 24 hs (3) 6-10 episódios em 24 hs (4) > 10 episódios em 24 hs / necessidade de suporte parenteral	
65. Diarréia	(0) nenhuma (1) aumento 2-3 evacuações/dia em relação ao pré-tratamento (2) aumento de 4-6 evacuações/dia ou evacuações noturnas ou cólicas moderada (3) aumento de 7-9 evacuações/dia ou incontinência ou cólicas severas (4) aumento \geq 10 evacuações/dia ou diarréia com sangue ou necessidade de suporte parenteral	
66. Estomatite	(0) nenhuma (1) úlceras indolores, eritemas ou inflamação leve (2) eritema, edema ou úlcera dolorosos, mas pode comer (3) eritema, edema ou úlcera dolorosos e não pode comer (4) exige suporte enteral ou parenteral	
67. Bilirrubina	(0) DLN* (1) não marcar (2) $1,5 \times N^{**}$ (3) $1,5 - 3,0 \times N$ (4) $> 3,0 \times N$	
68. TGO	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
69. TGP	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
70. Fosf. Alcalina	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
71. Hb (g/100 ml)	(0) DLN (1) $10,0 - N$ (2) $8,0 - 9,9$ (3) $6,5 - 7,9$ (4) $< 6,5$	
72. Leucócitos (x 1000/mm³)	(0) $\geq 4,0$ (1) $3,0 - 3,9$ (2) $2,0 - 2,9$ (3) $1,0 - 1,9$ (4) $< 1,0$	

73. Granulócitos (x 1000/mm³)	(0) ≥ 2,0 (1) 1,5 – 1,9 (2) 1,0 – 1,4 (3) 0,5 – 0,9 (4) < 0,5	
74. Plaquetas (x 1000/mm³)	(0) DLN (1) 75 - N (2) 50 – 74,9 (3) 25 – 49,9 (4) < 25	
75. Hemorragia (clínica)	(0) nenhuma (1) leve, sem transfusão (2) grande; 1-2 unidades de transfusão por episódio (3) grande; 3-4 unidades de transfusão por episódio (4) maciça, > 4 unidades de transfusão por episódio	
76. Toxicidade pulmonar	(0) nenhuma (1) assintomático, com alteração ao exame físico (2) dispnéia sob esforço (3) dispnéia sob nível normal de atividade (4) dispnéia em repouso	
77. Toxicidade cutânea	(0) ausente (1) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema assintomáticos (2) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema com prurido ou outros sintomas associados (3) máculas, pápulas ou erupções vesiculares sintomáticas generalizadas (4) dermatite esfoliativa ou ulcerativa	
78. Alopecia	(0) sem queda (1) perda leve (2) queda pronunciada ou total	
79. Infecção	(0) ausente (1) leve (2) moderada (3) grave (4) risco de vida	
80. Creatinina	(0) DLN (1) < 1,5 x N (2) 1,5 – 3,0 x N (3) 3,1 – 6,0 x N (4) > 6,0 x N	
81. Hematúria	(0) negativo (1) somente microscópica (2) macroscópica, sem coágulos (3) com coágulos (4) requer transfusão	
82. Toxicidade cardíaca (função)	(0) ausente (1) assintomático, declínio da FE em repouso em menos de 20% do valor basal (2) assintomático, declínio da FE em repouso em mais de 20% do valor basal (3) ICC leve, responsiva a terapia (4) ICC grave ou refratária	
83. Toxicidade cardíaca (arritmias)	(0) ausente (1) assintomático, transitória ou sem necessidade de terapia (2) recorrente ou persistente, sem necessidade de terapia (3) requer tratamento (4) requer monitorização ou hipotensão ou taquicardia ou fibrilação ventricular	
84. Toxicidade cardíaca (pericárdio)	(0) ausente (1) efusão assintomática, não requer transfusão (2) pericardite (atrato, dor torácica e alterações no ECG) (3) requer drenagem (4) tamponamento cardíaco	
85. Neurotoxicidade (sensorial)	(0) ausente (1) parestesias leves (2) perda sensorial objetiva leve a moderada (3) perda sensorial objetiva grave ou parestesias que interferem com a função	

86. Alívio de sintomas (relacionados ao tumor)	(0) não (1) sim	
87. Tamanho ao exame físico (maior diâmetro)		
3º ciclo		
Caso este ciclo seja suspenso, vá para o item 140		
88. Data de início		
89. Náuseas	(0) nenhuma (1) ingestão razoável (2) ingestão significativamente diminuída (3) sem ingestão oral	
90. Vômitos	(0) ausente (1) 1 episódio em 24 hs (2) 2-5 episódios em 24 hs (3) 6-10 episódios em 24 hs (4) > 10 episódios em 24 hs / necessidade de suporte parenteral	
91. Diarréia	(0) nenhuma (1) aumento 2-3 evacuações/dia em relação ao pré-tratamento (2) aumento de 4-6 evacuações/dia ou evacuações noturnas ou cólicas moderada (3) aumento de 7-9 evacuações/dia ou incontinência ou cólicas severas (4) aumento \geq 10 evacuações/dia ou diarréia com sangue ou necessidade de suporte parenteral	
92. Estomatite	(0) nenhuma (1) úlceras indolores, eritemas ou inflamação leve (2) eritema, edema ou úlcera dolorosos, mas pode comer (3) eritema, edema ou úlcera dolorosos e não pode comer (4) exige suporte enteral ou parenteral	
93. Bilirrubina	(0) DLN* (1) não marcar (2) $1,5 \times N^{**}$ (3) $1,5 - 3,0 \times N$ (4) $> 3,0 \times N$	
94. TGO	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
95. TGP	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
96. Fosf. Alcalina	(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$	
97. Hb (g/100 ml)	(0) DLN (1) $10,0 - N$ (2) $8,0 - 9,9$ (3) $6,5 - 7,9$ (4) $< 6,5$	
98. Leucócitos (x 1000/mm ³)	(0) $\geq 4,0$ (1) $3,0 - 3,9$ (2) $2,0 - 2,9$ (3) $1,0 - 1,9$ (4) $< 1,0$	
99. Granulócitos (x 1000/mm ³)	(0) $\geq 2,0$ (1) $1,5 - 1,9$ (2) $1,0 - 1,4$ (3) $0,5 - 0,9$ (4) $< 0,5$	
100. Plaquetas (x 1000/mm ³)	(0) DLN (1) $75 - N$ (2) $50 - 74,9$ (3) $25 - 49,9$ (4) < 25	

101. Hemorragia (clínica)	(0) nenhuma (1) leve, sem transfusão (2) grande; 1-2 unidades de transfusão por episódio (3) grande; 3-4 unidades de transfusão por episódio (4) maciça, > 4 unidades de transfusão por episódio	
102. Toxicidade pulmonar	(0) nenhuma (1) assintomático, com alteração ao exame físico (2) dispnéia sob esforço (3) dispnéia sob nível normal de atividade (4) dispnéia em repouso	
103. Toxicidade cutânea	(0) ausente (1) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema assintomáticos (2) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema com prurido ou outros sintomas associados (3) máculas, pápulas ou erupções vesiculares sintomáticas generalizadas (4) dermatite esfoliativa ou ulcerativa	
104. Alopecia	(0) sem queda (1) perda leve (2) queda pronunciada ou total	
105. Infecção	(0) ausente (1) leve (2) moderada (3) grave (4) risco de vida	
106. Creatinina	(0) DLN (1) < 1,5 x N (2) 1,5 – 3,0 x N (3) 3,1 – 6,0 x N (4) > 6,0 x N	
107. Hematúria	(0) negativo (1) somente microscópica (2) macroscópica, sem coágulos (3) com coágulos (4) requer transfusão	
108. Toxicidade cardíaca (função)	(0) ausente (1) assintomático, declínio da FE em repouso em menos de 20% do valor basal (2) assintomático, declínio da FE em repouso em mais de 20% do valor basal (3) ICC leve, responsiva a terapia (4) ICC grave ou refratária	
109. Toxicidade cardíaca (arritmias)	(0) ausente (1) assintomático, transitória ou sem necessidade de terapia (2) recorrente ou persistente, sem necessidade de terapia (3) requer tratamento (4) requer monitorização ou hipotensão ou taquicardia ou fibrilação ventricular	
110. Toxicidade cardíaca (pericárdio)	(0) ausente (1) efusão assintomática, não requer transfusão (2) pericardite (atrato, dor torácica e alterações no ECG) (3) requer drenagem (4) tamponamento cardíaco	
111. Neurotoxicidade (sensorial)	(0) ausente (1) parestesias leves (2) perda sensorial objetiva leve a moderada (3) perda sensorial objetiva grave ou parestesias que interferem com a função	
112. Alívio de sintomas (relacionados ao tumor)	(0) não (1) sim	
113. Tamanho ao exame físico (maior diâmetro)		

4º ciclo		
Caso este ciclo seja suspenso, vá para o item 140		
114. Data de início		
115. Náuseas	<p>(0) nenhuma (1) ingestão razoável (2) ingestão significativamente diminuída (3) sem ingestão oral</p> <p>(0) ausente (1) 1 episódio em 24 hs (2) 2-5 episódios em 24 hs (3) 6-10 episódios em 24 hs (4) > 10 episódios em 24 hs / necessidade de suporte parenteral</p> <p>(0) nenhuma (1) aumento 2-3 evacuações/dia em relação ao pré-tratamento (2) aumento de 4-6 evacuações/dia ou evacuações noturnas ou cólicas moderada (3) aumento de 7-9 evacuações/dia ou incontinência ou cólicas severas (4) aumento \geq 10 evacuações/dia ou diarreia com sangue ou necessidade de suporte parenteral</p> <p>(0) nenhuma (1) úlceras indolores, eritemas ou inflamação leve (2) eritema, edema ou úlcera dolorosos, mas pode comer (3) eritema, edema ou úlcera dolorosos e não pode comer (4) exige suporte enteral ou parenteral</p> <p>(0) DLN* (1) não marcar (2) $1,5 \times N^{**}$ (3) $1,5 - 3,0 \times N$ (4) $> 3,0 \times N$</p> <p>(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$</p> <p>(0) DLN (1) $\leq 2,5 \times N$ (2) $2,6 - 5 \times N$ (3) $5,1 - 20 \times N$ (4) $> 20 \times N$</p> <p>(0) DLN (1) $10,0 - N$ (2) $8,0 - 9,9$ (3) $6,5 - 7,9$ (4) $< 6,5$</p> <p>(0) $\geq 4,0$ (1) $3,0 - 3,9$ (2) $2,0 - 2,9$ (3) $1,0 - 1,9$ (4) $< 1,0$</p> <p>(0) $\geq 2,0$ (1) $1,5 - 1,9$ (2) $1,0 - 1,4$ (3) $0,5 - 0,9$ (4) $< 0,5$</p> <p>(0) DLN (1) $75 - N$ (2) $50 - 74,9$ (3) $25 - 49,9$ (4) < 25</p> <p>(0) nenhuma (1) leve, sem transfusão (2) grande; 1-2 unidades de transfusão por episódio (3) grande; 3-4 unidades de transfusão por episódio (4) maciça, > 4 unidades de transfusão por episódio</p> <p>(0) nenhuma (1) assintomático, com alteração ao exame físico (2) dispnéia sob esforço (3) dispnéia sob nível normal de atividade (4) dispnéia em repouso</p>	
116. Vômitos		
117. Diarreia		
118. Estomatite		
119. Bilirrubina		
120. TGO		
121. TGP		
122. Fosf. Alcalina		
123. Hb (g/100 ml)		
124. Leucócitos (x 1000/mm³)		
125. Granulócitos (x 1000/mm³)		
126. Plaquetas (x 1000/mm³)		
127. Hemorragia (clínica)		
128. Toxicidade pulmonar		

129. Toxicidade cutânea	(0) ausente (1) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema assintomáticos (2) mácula dispersa ou erupção papular ou eritema com prurido ou outros sintomas associados (3) máculas, pápulas ou erupções vesiculares sintomáticas generalizadas (4) dermatite esfoliativa ou ulcerativa	
130. Alopecia	(0) sem queda (1) perda leve (2) queda pronunciada ou total	
131. Infecção	(0) ausente (1) leve (2) moderada (3) grave (4) risco de vida	
132. Creatinina	(0) DLN (1) < 1,5 x N (2) 1,5 – 3,0 x N (3) 3,1 – 6,0 x N (4) > 6,0 x N	
133. Hematúria	(0) negativo (1) somente microscópica (2) macroscópica, sem coágulos (3) com coágulos (4) requer transfusão	
134. Toxicidade cardíaca (função)	(0) ausente (1) assintomático, declínio da FE em repouso em menos de 20% do valor basal (2) assintomático, declínio da FE em repouso em mais de 20% do valor basal (3) ICC leve, responsiva a terapia (4) ICC grave ou refratária	
135. Toxicidade cardíaca (arritmias)	(0) ausente (1) assintomático, transitória ou sem necessidade de terapia (2) recorrente ou persistente, sem necessidade de terapia (3) requer tratamento (4) requer monitorização ou hipotensão ou taquicardia ou fibrilação ventricular	
136. Toxicidade cardíaca (pericárdio)	(0) ausente (1) efusão assintomática, não requer transfusão (2) pericardite (atrato, dor torácica e alterações no ECG) (3) requer drenagem (4) tamponamento cardíaco	
137. Neurotoxicidade (sensorial)	(0) ausente (1) parestesias leves (2) perda sensorial objetiva leve a moderada (3) perda sensorial objetiva grave ou parestesias que interferem com a função	
138. Alívio de sintomas (relacionados ao tumor)	(0) não (1) sim	
139. Tamanho ao exame físico (maior diâmetro)		
Avaliação após o tratamento de indução		
140. Quantos ciclos de Qt completou	(0) nenhum (1) um (2) dois (3) três (4) quatro	
141. Motivo da interrupção	(0) completou os quatro ciclos (1) toxicidade (2) progressão tumoral Se alternativa (1), definir qual toxicidade determinou a interrupção:	

142. Medida do maior diâmetro pelo exame de imagem		
143. Determinação da resposta clínica (TC ou RNM, de acordo com os critérios do RECIST)	(1) resposta completa (RC) (2) resposta parcial (RP) (3) doença estável (DE) (4) progressão de doença (PD)	
Dados da cirurgia		
144. Data da cirurgia		
145. Classificação da cirurgia quanto à ressecabilidade	(0) não operou (1) ressecção adequada (margens tridimensionais de 1,5 a 2,0 cm) (2) ressecção marginal (3) ressecção incompleta (doença macroscópica residual)	
146. Classificação da cirurgia quanto à extensão da ressecção	(0) não operou (1) ressecção de partes moles, com preservação do membro (2) ressecção alargada (vasos, nervos, osso ou vísceras), com preservação do membro (3) amputação ou desarticulação clássica (4) amputação ou desarticulação alargada	
147. Classificação quanto ao tipo de reconstrução	(0) não operou (1) retalho fásquio-cutâneo (2) retalho miocutâneo (3) reconstrução microcirúrgica	
148. Caso a resposta aos três itens anteriores for (0), Qual o motivo da suspensão da cirurgia	(0) não se aplica, pois operou (1) óbito por complicação da Qt (2) progressão local durante a Qt (3) progressão sistêmica	
149. Data da alta hospitalar		
150. Complicações pós-operatórias	(0) não houve (1) sim, relacionadas à FO (2) sim, mas não relacionadas à FO (3) sim; complicações clínicas no período pós-operatório (até 30º dia PO)	
151. Tipo de complicação cirúrgica	(0) não houve (1) hemorragia trans-operatória (2) hemorragia pós-operatória, com necessidade de reintervenção (3) hematoma de FO, sem necessidade de reoperação (4) seroma (5) deiscência de FO, sem infecção (6) infecção de FO (7) perda de retalho (quando rotação de miocutâneo ou microcirúrgico) (8) trombose de enxerto vascular	
152. Agente infeccioso isolado em caso de infecção		

153. Em caso de seroma, quantas punções foram realizadas?		
154. Tipo de complicação clínica	(0) não houve (1) infecção respiratória (2) embolia pulmonar (3) congestão pulmonar (4) IAM (5) TVP (6) descompensação de DM (7) AVC (8) outras	
Dados da Anatomia Patológica (peça cirúrgica)		
Número do exame:		
155. Tipo histológico		
156. Grau histológico	(1) baixo grau (2) alto grau	
157. Margens microscópicas	(0) não avaliadas (1) livres e amplas (2) livres, porém exúguas (3) comprometidas	
158. Percentagem de necrose		
159. Percentagem de células viáveis		
Dados da radioterapia adjuvante		
160. Realizou ?	(0) não (1) sim Se não, vá para o item 136	
161. Toxicidade aguda à Rxt	(0) não houve (1) dermatite grau ____ (2) neurotoxicidade grau ____	
Dados do seguimento		
162. Recidiva	(0) não (1) sim, local (2) sim, à distância (3) sim, local e à distância, sincronicamente	
163. Data da recidiva (1º sítio)		
164. Data da última informação ou consulta		
165. Status na última informação ou consulta	(1) vivo, sem doença (2) vivo, com doença (3) morte por outra causa (4) morte por câncer (5) perda de seguimento	

Anexo 3 – Protocolo de Imunoistoquímica padronizado (Adaptado Envision Flex/HRP)

Primeiro dia:

1. Desparafinização.
 - Banho em xilol (5 min);
 - Banho nós alcoóis;
 - Lavagem em água corrente (5 min).
2. Recuperação antigênica panela de pressão - EDTA/Tris, pH:9,0, por 25 min.
 - 0,3722g de EDTA
 - 1,2110g de TRIS
 - 1000 ml de água destilada – acertar o pH
 - Esperar esfriar na própria solução (20min).
3. Lavagem em água corrente 5 min.
4. Bloqueio da peroxidase endógena (2X 5min).
5. Lavagem em tampão (Wash buffer 1X - DAKO)(2X5min).
 - Concentrado 20x – 1900ml de água destilada para 100ml de tampão.
6. Aplicação do Ac primário (overnight – aproximadamente 20 horas de incubação).

Segundo dia:

7. Lavagem em tampão (Wash buffer 1X - DAKO)(2X5min).
8. Aplicação Envision FLEX/HRP-polímero (20min).
9. Lavagem em tampão (Wash buffer 1X - DAKO)(2X5min).
10. Aplicação do DAB (5min).
 - Adicionar 20 gotas do concentrado no frasco do diluente.
11. Lavagem em água corrente (5 min).
12. Contra coloração em Hematoxilina de Harris (1min.).
 - Filtrar a Hematoxilina.
13. Mergulhar as lâminas no diferenciador (poucos segundos).
14. Lavagem em água corrente (5 min).
15. Desidratação e montagem.

Anexo 4 – Marcadores Imunoistoquímicos - Informações técnicas

FST - Follistatin (Sigma)
Anticorpo policlonal obtido de coelho (diluição de 1:50, Sigma) e precursor recombinante da <i>protein signature tag</i> (PrEST). Considerado como antagonista das ativinas e pertencente a superfamília TGF β . Função na reprodução e na regulação do desenvolvimento de tecidos humanos. Usado como marcador molecular de doença cardiovascular e de tumores, por exemplo, do trato gastrointestinal, melanoma, linfoma e de pele. Tem localização tanto no núcleo quanto no citoplasma. Sua descrição, isoformas e mais informações podem ser encontradas no site http://www.proteinatlas.org/ENSG00000134363/summary .
SMAD 4 (Novus)
Anticorpo monoclonal obtido de camundongo (clone IMD-89, diluição de 1:80, Novus Biologicals). É uma proteína que está implicada na função da via de sinalização mediada por TGF β /BMP. Também chamada de DPC4, tem se mostrado responsável por mediar as atividades da via pela interação com praticamente todos os pertencentes da família SMAD. De localização tanto no núcleo quanto no citoplasma, tem papel de supressor tumoral na via TGF β além de funções relacionadas a crescimento celular e fenômenos de apoptose. Mais informações estão disponíveis no site http://www.novusbio.com/SMAD4-Antibody-IMD-89_NBP1-42582.html
TGFβ - Transforming growth factor beta (Novocastra)
Anticorpo monoclonal obtido em camundongo (clone TGFB17, diluição 1:100, Novocastra). Polipeptídeo homodímero com 25kD com funcionando como potente regulador celular. De localização citoplasmática, tem efeitos no crescimento e diferenciação celular além de outros aspectos do metabolismo como produção de

matriz extracelular. Informações técnicas podem ser obtidas no site (pdf):
http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/novocastra_reagents/Novocastra_datasheets/tgfb.pdf

Id1 - *Inhibitor of differentiation 1* (Abcam)

Anticorpo monoclonal obtido em camundongo (clone 2456C1a, diluição 1:100, Abcam). Tem localização nuclear e citoplasmática. Tem a habilidade de formar heterodímero como proteínas HLH, inibindo a ligação com DNA. Tem função na diferenciação celular, proliferação, angiogênese e invasão tumoral. Elevados níveis de Id1 estão relacionados a agressividade tumoral. Informações técnicas podem ser obtidas no site: <http://www.abcam.com/Id1-antibody-2456C1a-ab66495.html>

Anexo 5 - Termo de Consentimento ao Ensaio Clínico e Estudo molecular

Hospital A.C.Camargo– Fundação Antônio Prudente

R. Professor Antônio Prudente, 211 – telefone: 2189-5000

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

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

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

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

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE: _____

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

Documento de identidade n: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Tel: _____

RESPONSÁVEL: _____

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

Documento de identidade n: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Tel: _____

II. OBJETIVOS DO ESTUDO

O tratamento dos sarcomas de partes moles de alto grau localizados em extremidades atualmente é baseado na radioterapia, concomitante ou não à quimioterapia, seguida de cirurgia para retirada do tumor. O tratamento pré-operatório (neoadjuvante) tem por objetivo diminuir o tamanho do tumor, possibilitando a preservação do membro, e diminuir as chances de recidiva no local. As taxas de complicações relacionadas à ferida operatória têm sido elevadas e podem estar associadas ao emprego da radioterapia antes da cirurgia. Essas complicações atrasam ou até impedem a realização de quimioterapia após a

cirurgia (adjuvante), a qual tem por objetivo a erradicação de células cancerosas que não são detectáveis aos exames habituais (micrometástases) e podem vir a se desenvolver em outros órgãos, no futuro. A realização exclusivamente de quimioterapia antes da cirurgia (neoadjuvante) teria as vantagens potenciais (teóricas) de iniciar precocemente o tratamento das micrometástases e diminuir as taxas de complicações de cicatrização atribuídas à radioterapia.

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

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

III. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS E DURAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

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

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

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

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

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

Após término da radioterapia, estão previstos mais quatro ciclos de quimioterapia, semelhantes aos realizados antes da cirurgia, utilizando-se as mesmas drogas.

Portanto, o tratamento prevê três meses de quimioterapia, dois meses para cirurgia e radioterapia e mais quatro meses de quimioterapia, completando nove meses de tratamento, aproximadamente.

IV. RISCOS POTENCIAIS

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

Doxorrubicina: mielossupressão (diminuição da produção de células do sangue que são responsáveis pela coagulação, defesa e nutrição dos tecidos e órgãos do

corpo) podendo resultar em infecções e hemorragias; alterações cardíacas agudas ou crônicas, (pericardite ou miocardiopatia, que significam inflamação da membrana que reveste o coração ou do próprio músculo cardíaco) e que podem causar fraqueza nos batimentos do coração; náuseas; vômitos; mucosite, que é a inflamação do tecido de revestimento interno de todo o intestino; alopecia (queda de cabelo); disfunção sexual e reprodutiva.

Ifosfamida: alterações urinárias, como cistite, que é a inflamação do tecido que reveste internamente a bexiga, hematúria (sangramento na urina) e alterações na função dos rins; mielossupressão, (diminuição da produção de células do sangue que são responsáveis pela coagulação, defesa e nutrição dos tecidos e órgãos do corpo) podendo resultar em infecções e hemorragias; náuseas; vômitos; mucosite que é a inflamação do tecido de revestimento interno de todo o intestino; alterações da função hepática; alopecia (queda de cabelo); disfunção sexual e reprodutiva

Mesna: náuseas ou vômitos.

V. BENEFÍCIOS PREVISTOS

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

VI. TRATAMENTOS ALTERNATIVOS AO OBJETO DA PESQUISA

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

VII. SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE

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

VIII. ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Você não terá nenhum tipo de remuneração ao aceitar este tratamento. A pesquisa não envolve nenhuma forma de compensação financeira aos participantes.

O Hospital A.C. Camargo, assim como os médicos responsáveis pela pesquisa, não se isentarão da responsabilidade legal sobre os eventuais malefícios que possam acometer o paciente, desde que os mesmos advenham da intervenção realizada no estudo.

IX. ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA

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

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

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

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

Dr. Ranyell Matheus Spencer S. Batista

Hospital A. C. Camargo– Tel: 2189-5000. Ramais: 2303 ou 2304.

Para tirar qualquer dúvida ética sobre o estudo você poderá entrar em contato com:

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa - Hospital A. C. Camargo– Tel: 2189-5020.

XI. CONSENTIMENTO LIVRE E PÓS-INFORMADO

Eu declaro que li e compreendi a proposta de tratamento e fui convenientemente esclarecido pessoalmente pelo pesquisador. Declaro que entendo os riscos da minha doença, o objetivo do estudo e os riscos e benefícios do tratamento. Declaro que, de forma voluntária, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa. Declaro também que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto na utilização dos fragmentos do tumor coletados para a criação de um banco de tumores e, posteriormente, a determinação de fatores moleculares relacionados com resposta clínica e patológica ao tratamento quimioterápico ou fatores relacionados ao prognóstico.

São Paulo, ____/____/____.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

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

_____.

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Termo de Consentimento para o estudo molecular/imunoistoquímico

Hospital A.C.Camargo–Fundação Antônio Prudente

R. Professor Antônio Prudente, 211 – telefone: 2189-5000

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

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

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

PROJETO: Avaliação gênica e protéica de genes da via de sinalização mediada por TGF β como preditores de resposta à quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ifosfamida em adultos portadores de sarcoma de partes moles de alto grau em extremidades.

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE: _____

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

Documento de identidade n: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Tel: _____

RESPONSÁVEL: _____

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

Documento de identidade n: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Tel: _____

II. OBJETIVOS DO ESTUDO

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

O grau de malignidade histológica é atualmente o único fator capaz de prever, com acurácia ainda razoável, a eficácia do tratamento pré-operatório, ou seja, as taxas de resposta. É possível que algumas características genéticas armazenadas

no tumor possam também ter essa capacidade e, talvez, com maior precisão. Até o momento, não se conhecem estudos publicados em sarcomas de partes moles que respondam adequadamente a esse questionamento.

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

III. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

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

Nessa análise, cujas técnicas se chamam PCR em tempo real e imunohistoquímica, serão analisados genes que possivelmente estão envolvidos em resposta a quimioterapia.

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

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

IV. RISCOS POTENCIAIS

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

V. BENEFÍCIOS PREVISTOS

Não há benefício direto previsto para os participantes desse estudo. Esperamos que, ao identificar fatores genéticos com alta capacidade de predizer resposta ao tratamento, outras populações possam vir a se beneficiar, no futuro, de critérios mais acurados de indicação do tratamento.

VI. SALVAGUARDA DE CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE

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

VII. ESCLARECIMENTOS SOBRE COMPENSAÇÕES OU DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Você não terá nenhum tipo de remuneração ao aceitar participar desse estudo. A pesquisa não envolve nenhuma forma de compensação financeira aos participantes.

Como a pesquisa envolve análise de alterações genéticas apenas no tumor e não de características genéticas herdadas pelo indivíduo, não estão previstos programas de aconselhamento genético.

VIII. ESCLARECIMENTOS SOBRE OUTROS DIREITOS DO PACIENTE SUJEITO À PESQUISA

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

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

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

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

Dr. Ranyell Matheus Spencer S. Batista

Hospital A. C. Camargo– Tel: 2189-5000. Ramais: 2303 ou 2304.

Para tirar qualquer dúvida ética sobre o estudo você poderá entrar em contato com:

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa - Hospital A. C. Camargo– Tel: 2189-5020.

X. CONSENTIMENTO LIVRE E PÓS-INFORMADO

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

São Paulo, ___/___/____.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

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

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Anexo 6 – Documento de aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Hospital A.C.Camargo



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 06 de Maio de 2009.

Ao
Dr. Ademar Lopes

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1202/09

“Avaliação gênica e proteômica de genes da via de sinalização mediada por TGFβ como preditores de resposta à quimioterapia neoadjuvante com doxorubicina e ifosfamida em adultos portadores de sarcoma de partes moles de alto grau em extremidades”.

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, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 17/02/2009, aprovaram a realização do estudo em referência, do Termo de Consentimento Livre Esclarecido para ensaio clínico (referente projeto principal), do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para estudo genético e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções CNS;
- Declaração de Infra-Estrutura e Instalações;
- Declaração sobre o plano de recrutamento dos sujeitos de pesquisa, circunstâncias e responsáveis pela obtenção do TCLE;
- Declaração sobre uso e destino do material biológico, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Orçamento financeiro detalhado;
- Plano de Trabalho;
- Tabela com iniciais e RGH's dos pacientes;
- Ficha para Coleta de Dados;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Imagem – Medicina Nuclear;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Imagem;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncologia Clínica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia Pélvica;
- 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 6 meses.

Atenciosamente,

Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa