

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DE GENES EM OSTEOSSARCOMA

VIVIANE SONAGLIO

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

Área de Concentração: Oncologia

**Orientador: Dr. André Luiz Vettore de Oliveira
Co-Orientador: Profa. Dra. Beatriz de Camargo**

**São Paulo
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Sonaglio, Viviane

Avaliação do perfil de metilação da região promotora de genes em osteossarcoma / Viviane Sonaglio – São Paulo, 2008.

79p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: André Luiz Vettore de Oliveira

Descritores: 1. OSTEOSSARCOMA. 2. NEOPLASIAS ÓSSEAS.
3. METILAÇÃO. 4. GENES. 5. SOBREVIDA. 6. CRIANÇA. 7.
ADOLESCENTE.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todos os pacientes que, através de coragem e dedicação, me ensinam o verdadeiro sentido da palavra vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus amados pais, **Adair e Maria Inez**, por todo amor, incentivo e dedicação em todos os momentos da minha vida. Agradeço por todos os esforços e abdições realizados em suas vidas para permitirem que eu realizasse os meus sonhos.

Agradeço meu querido companheiro, **Júnior**, pelo amor, estímulo e compreensão nas fases difíceis e por acreditar em mim em todos os momentos.

Agradeço minha irmã **Carol**, meu cunhado **César** e meu sobrinho **Pepe** por facilitarem muito a minha vida em momentos difíceis.

Agradeço meus sogros, **Nilton e Maria Esperança** pelo apoio e estímulo.

Agradeço ao verdadeiro sentido da minha vida - minha "filhinha" **Ana Lú**.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Dr. André Vettore**, por todos os ensinamentos e pela orientação neste trabalho. Agradeço pelas vezes que colocou seu avental e foi para a bancada me ajudar a “pulverizar osso”. Agradeço pela paciência e pela compreensão, pois diante de tantas surpresas durante a realização deste trabalho, sempre acreditou que iríamos terminar e que tudo daria certo.

A minha co-orientadora **Prof^a Dra. Beatriz de Camargo**, que sempre foi um exemplo profissional de competência e sucesso. Agradeço pela contribuição e pelos ensinamentos na minha vida profissional como oncologista pediátrica e por ter me incentivado a entrar no mundo da biologia molecular e assim concluir este trabalho.

A **Dra. Silvia Toledo**, pesquisadora do IOP, pela imprescindível colaboração neste trabalho, tanto pelas amostras compartilhadas, como por sempre mostrar-se prestativa para discutirmos qualquer dúvida relacionada ao nosso trabalho. Não posso deixar de agradecer os ensinamentos na área da genética básica há 12 anos atrás.

Ao **Dr. André Lopes Carvalho** por ter disponibilizado parte de seu tempo para discutirmos os resultados e pela análise estatística deste trabalho.

A **Dra. Cecília Maria Lima da Costa**, minha amiga e chefe do departamento de Oncologia Pediátrica do Hospital AC Camargo, pela amizade e por todas as oportunidades que tem me oferecido e por sempre acreditar em mim. Agradeço muito pelo apoio e estímulo para a conclusão deste trabalho.

A **Andréa Kurashima** pela grande ajuda no entendimento do programa estatístico *SPSS* e pelo apoio indispensável na conclusão deste trabalho.

Aos meus queridos amigos do Departamento de Pediatria **Roberta, Gustavo e Luiz Fernando Lopes**, pela compreensão, estímulo e por terem permitido que eu me ausentasse para que eu concluísse este trabalho

As pessoas que conheci no laboratório e que hoje eu considero grandes amigas **Val, Clau e Roberta**. Principalmente por terem tornado estes momentos vividos no laboratório muito prazerosos e pela amizade que levarei para sempre.

Ao grande amigo e parceiro de profissão **Luis Henrique Sakamoto** pelo exemplo de amigo e profissional que sempre foi para mim, por tudo que me ensinou e pela parceria na residência médica e no laboratório.

A **Carolzinha**, minha grande amiga, pelo exemplo de persistência e brilhantismo em tudo que se dispõe a fazer, pela imprescindível ajuda na biologia molecular e em toda realização deste trabalho. Agradeço pela amizade que com certeza levaremos para sempre.

Ao Departamento de Anatomia-Patológica, em nome de **Dr. Fernando Soares e Dra. Isabela Werneck** por terem fornecido as amostras de tecido tumoral para a realização deste trabalho.

Ao Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME), principalmente a Sra. **Irde Contesini** e principalmente ao **Luis** pela ajuda na coleta dos dados no prontuário e por sempre entender minha falta de tempo.

As queridas amigas da Biblioteca, **Sra. Suely** pela competência e profissionalismo na revisão das referências bibliográficas e formatação deste trabalho, **Fran e Rose** pela importante e sempre disponível ajuda pela busca aos inúmeros artigos e pelo carinho durante todo este tempo.

Ao **Dr. Jose Andrés Yunes e Dra. Maria Tereza**, por disponibilizar seus preciosos tempos à leitura dos relatórios e pelas indispensáveis sugestões, durante a qualificação deste trabalho.

A Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente, principalmente ao Dr. Luis **Fernando Lima Reis, a Ana Maria Kuninari e a Luciana Pitombeira** pela ajuda e compreensão desde o início deste trabalho e principalmente pela compreensão nas inúmeras surpresas durante a realização e finalização desta tese.

A minha **banca julgadora** pela avaliação desta dissertação.

A todas as dificuldades enfrentadas, por terem me estimulado cada vez mais a desejar concluir este trabalho.

A **Deus** por tudo que tem me proporcionado, tanto na vida profissional como na vida pessoal e principalmente pela maior e melhor “surpresa” durante a realização deste estudo – Ana Luiza.

RESUMO

Sonaglio V. **Avaliação do perfil de metilação da região promotora de genes em osteossarcoma**. São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O osteossarcoma é o mais comum tumor ósseo maligno da infância e adolescência, correspondendo a aproximadamente 5% dos tumores nesta faixa etária. Acomete principalmente a metáfise dos ossos longos. O pico de incidência é a segunda década de vida. Aproximadamente 20% dos pacientes apresentam metástase ao diagnóstico, sendo o pulmão o sítio mais freqüente, seguido por metástases ósseas. Vários fatores prognósticos tem sido propostos como ressecabilidade do tumor primário, presença de metástases e grau de necrose induzido pelo tratamento pré-operatório. Apesar de todos os avanços obtidos com os métodos diagnósticos, no campo da quimioterapia e das técnicas cirúrgicas a sobrevida global em 5 anos do osteossarcoma para pacientes não metastáticos permanece em torno de 70% e para pacientes metastáticos a sobrevida é aproximadamente 20-30%. Desta forma, os estudos hoje tem se voltado para um maior entendimento sobre a biologia do osteossarcoma. A metilação é um mecanismo epigenético e está implicado no silenciamento de diversos genes supressores de tumor. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil de hipermetilação da região promotora de 18 genes supressores de tumor (*AIM1*, *APC*, *CALCA*, *CCNA1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK*, *ESR1*, *GSTP1*, *HIC1*, *MLH1*, *p14^{ARF}*, *RARβ*, *RASSF1A*, *RB1*, *SOCS1*, *THBS1* e *SFRP1*) em

amostras de osteossarcoma sem tratamento quimioterápico prévio, através da técnica PCR quantitativa específica para metilação (QMSP) e verificar se existia alguma correlação entre os dados moleculares gerados e aspectos clinico-patológicos dos pacientes.

Sete genes apresentaram-se hipermetilados em pelo menos 30% das amostras analisadas: *AIM1*, *CALCA*, *CDH1*, *ESR1*, *HIC1*, *p14^{ARF}* e *SFRP*. A análise dos genes *AIM1*, *CALCA*, *HIC1* e *SFRP* não apresentaram correlação entre a presença de metilação e variáveis clínicas analisadas. Entretanto, a hipermetilação do gene *CDH1* apresentou uma associação significativa com a idade ao diagnóstico maior que 12 anos ($p=0,03$). A hipermetilação da região promotora do gene *p14^{ARF}* apresentou associação estatisticamente significativa com ausência de metástases ao diagnóstico ($p=0,04$). A hipermetilação do gene *ESR1* associou-se com uma pior sobrevida global dos pacientes analisados ($p=0,058$).

SUMMARY

Sonaglio V. [Gene promoter hypermethylation pattern in osteosarcoma] São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Osteosarcoma is the most common type of malignant bone cancer in childhood and adolescence, representing approximately 5% of tumors in this age group. It affects mainly the metaphysis of long bones. The incidence peak is in the second decade of life. Approximately 20% of patients have metastatic disease at diagnosis, being the lung the most frequent site, followed by bone metastases. Several prognostic factors have been proposed as primary tumor, presence of metastases and degree of necrosis by the pre-operative treatment. Despite all the advances obtained in the diagnostic methods, chemotherapy and surgical methods field, the 5 years overall survival for non metastatic patients remains around 70% and for metastatic patients the survival is approximately 20-30%. Thus, the studies nowadays have turned to a greater understanding of the biology of osteosarcoma. Methylation is an epigenetic mechanism and is involved in silencing of several tumor suppressor genes. The objective of this study aimed to determine the promoter region hypermethylation profile of 18 tumor suppressor genes (*AIM1*, *APC*, *CALCA*, *CCNA1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK*, *ESR1*, *GSTP1*, *HIC1*, *MLH1*, *p14^{ARF}*, *RAR β* , *RASSF1A*, *RB1*, *SOCS1*, *THBS1* e *SFRP1*) in osteosarcoma samples without previous chemotherapy treatment, through the quantitative methylation-specific PCR technique (QMSP). Seven genes showed hypermethylation in at least 30% of the samples analysed: *AIM1*, *CALCA*, *CDH1*, *ESR1*, *HIC1*, *p14^{ARF}* and *SFRP*. The analysis of *AIM1*, *CALCA*, *HIC1* and *SFRP* showed no correlation between the presence of methylation and clinical variables analysed. However, hypermethylation of *CDH1* showed a significant association with age at diagnosis higher than 12 years old ($p=0,03$). Hypermethylation of *p14^{ARF}* promoter region showed statistically significant association with the diagnosis of metastases ($p=0,04$). *ESR1* hypermethylation was associated with a worse overall survival in the patients tested ($p=0,058$).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sítios anatômicos mais freqüentes (percentuais aproximados) de osteossarcoma.	2
Figura 2	Exames de imagem de um paciente com osteossarcoma.	8
Figura 3	Metilação da citosina.	16
Figura 4	Propagação do modelo de metilação. DNMT3A/B catalisam reação de metilação em sítios não metilados previamente.	16
Figura 5	Estrutura da cromatina ativa e inativa.	19
Figura 6	Distribuição dos dinucleotídeos CpG no genoma humano e diferenças do perfil de metilação entre células normais e neoplásicas.	21
Figura 7	Sobrevida Global em 5 anos do grupo de 34 pacientes incluídos no estudo.	41
Figura 8	Sobrevida Global em 5 anos em relação à presença de metástase ao diagnóstico.	41
Figura 9	Sobrevida global em 5 anos em relação à recidiva tumoral após o tratamento quimioterápico de primeira linha.	42
Figura 10	Sobrevida global em 5 anos em relação ao grau de Necrose – (Huvos).	42
Figura 11	Sobrevida global em 5 anos em relação ao sítio primário.	43

Figura 12	Sobrevida global em 5 anos em relação ao tipo histológico.	43
Figura 13	Sobrevida global em 5 anos em relação ao sexo.	44
Figura 14	Sobrevida global em 5 anos em relação a idade.	44
Figura 15	Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com fragmentos de 283pb amplificados do gene <i>BRCA1</i> .	45
Figura 16	Sobrevida global – Gene <i>CDH1</i> : metilado x não-metilado.	56
Figura 17	Sobrevida global – Gene <i>CALCA</i> : metilado x não-metilado.	56
Figura 18	Sobrevida global – Gene <i>SFRP1</i> : metilado x não-metilado.	57
Figura 19	Sobrevida global – Gene <i>HIC1</i> : metilado x não-metilado.	57
Figura 20	Sobrevida global – Gene <i>p14</i> : metilado x não-metilado.	57
Figura 21	Sobrevida global – Gene <i>AIM1</i> : metilado x não-metilado.	58
Figura 22	Sobrevida global – Gene <i>ESR1</i> : metilado x não-metilado.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Seqüência dos primers direto e reverso para amplificação do fragmento de 283pb do gene BRCA1 – exon 11.	28
Tabela 2	Características clínicas e histológicas dos pacientes incluídos no estudo.	40
Tabela 3	Análise comparativa entre a população total de 60 casos de osteossarcoma e a população selecionada de 34 casos	48
Tabela 4	Análise comparativa entre a população total de 34 casos de osteossarcoma incluída no estudo e a população de 26 casos excluídos por inviabilidade das amostras.	50
Tabela 5	Freqüência de hipermetilação dos 18 genes avaliados nas 13 amostras de osteossarcoma incluídas no estudo piloto.	52
Tabela 6	Freqüência de hipermetilação dos 7 genes avaliados nas 34 amostras de osteossarcoma.	53
Tabela 7	Associação entre hipermetilação do gene <i>CDH1</i> e variáveis clínico-patológicas	54
Tabela 8	Associação entre hipermetilação do gene <i>CALCA</i> e variáveis clínico-patológicas.	55
Tabela 9	Associação entre hipermetilação do gene <i>SFRP1</i> e variáveis clínico-patológicas.	55
Tabela 10	Associação entre hipermetilação do gene <i>HIC1</i> e variáveis clínico-patológicas.	56
Tabela 11	Associação entre hipermetilação do gene <i>p14</i> e variáveis clínico-patológicas.	56
Tabela 12	Associação entre hipermetilação do gene <i>AIM1</i> e variáveis clínico-patológicas.	57
Tabela 13	Associação entre hipermetilação do gene <i>ESR1</i> e variáveis clínico-patológicas.	57

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACTB	Homo sapiens actin, beta
AIM1	Homo sapiens absent in melanoma 1
APC	Homo sapiens adenomatosis polyposis coli
CALCA	Homo sapiens calcitonin/calcitonin-related polypeptide
CCNA1	Homo sapiens cyclin A1
CCND2	Homo sapiens cyclin D2
CDH1	Homo sapiens cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CDKN2A	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (variante de splicing)
Ct	Cycle Threshold
DAPK	Homo sapiens death-associated protein kinase 1
DNA	Desoxyribonucleic Acid
ESR1	Homo sapiens estrogen receptor 1
GSTP1	Homo sapiens glutathione S-transferase pi
HIC1	Homo sapiens hypermethylated in cancer 1
M	Molar
mm	Milímetro
Mm	Milimolar
mm³	Milímetros cúbicos
MBP	<i>Methyl CpG binding protein</i>
MeCP	<i>Methyl-core binding protein</i>
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MLH1	Homo sapiens mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2
p14^{ARF}	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (variante de splicing)
P16	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (variante de splicing)
PCR	Polymerase Chain Reaction

RARB Homo sapiens retinoic acid receptor, beta
RASSF1A Homo sapiens Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1
RB1 Homo sapiens retinoblastoma 1
SFRP1 Homo sapiens secreted frizzled-related protein 1
SOCS1 Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 1
THBS1 Homo sapiens thrombospondin 1
μg Micrograma
μL Microlitro
μM Micromolar

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Osteossarcoma	1
1.2	Genética e Osteossarcoma	12
1.3	Metilação de Dna	15
1.4	Metilação do Dna e Câncer	19
1.5	Metilação e Osteossarcoma	21
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivos Gerais	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Casuística	26
3.2	Extração de DNA	27
3.3	Tratamento com Bissulfito de Sódio	29
3.4	PCR quantitativa específica para metilação (QMSP)	30
3.5	Metilação in Vitro de DNA de Linfócitos	35
3.6	Escolha dos Genes	35
3.7	Análise Estatística	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Caracterização da Casuística	38
4.2	Extração, Quantificação e Avaliação das Amostras de DNA	45
4.3	Analises de Hipermetilação em Osteossarcoma	49
4.3.1	Estudo Piloto	49
4.3.2	Análise Total	53
4.4	Correlação entre Hipermetilação e Características Clínico-Patológicas	53
5	DISCUSSÃO	61

6	CONCLUSÕES	72
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

ANEXO

Anexo 1 Quadro de nível de metilação das 34 amostras.

1 INTRODUÇÃO

1.1 OSTEOSSARCOMA

Osteossarcoma ou sarcoma osteogênico é o tumor primário ósseo derivado do mesênquima ósseo primitivo e caracteriza-se histologicamente pela produção de matriz osteóide ou osso imaturo pelas células ósseas mesenquimais malignas (DORFMAN e CZERNIAK 1995). O termo osteossarcoma foi usado pela primeira vez em 1805 pelo cirurgião francês Alexis Boyer (1757-1833) (HAM et al. 1998).

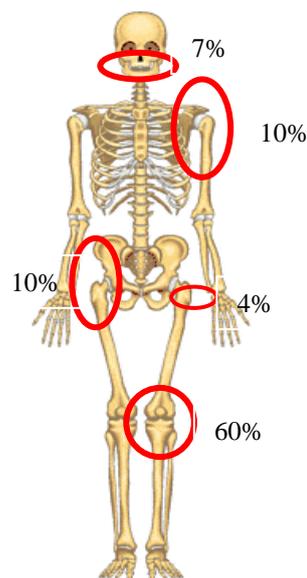
Em geral, tumores ósseos são raros, correspondem a 6% de todos os cânceres na faixa etária pediátrica, destes o osteossarcoma é o mais freqüente, seguido pelo Sarcoma de Ewing (GURNEY et al. 1999).

Segundo dados do programa de registro populacional de câncer dos Estados Unidos, (SEER – *Surveillance Epidemiology and End Results*) a incidência do osteossarcoma é de 400 casos novos / ano (8,7 casos / milhão de pacientes abaixo dos 20 anos) (GURNEY et al. 1999).

O osteossarcoma apresenta distribuição etária bimodal, com um primeiro pico de incidência na segunda década de vida, durante o estirão de crescimento e um segundo pico em indivíduos idosos. Em crianças abaixo de 5 anos correspondem a 0,5% de todas as neoplasias, comparado com 5% para crianças entre 5 e 9 anos, 11% para aquelas entre 10 e 14 anos e 8% para aquelas entre 15 e 19 anos (GURNEY et al. 1999). Estudos

demonstram uma incidência maior deste tumor em meninos do que em meninas e indivíduos da raça negra apresentam uma frequência maior de acometimento do que indivíduos caucasianos (LINK et al. 2006).

Embora o osteossarcoma possa ocorrer em qualquer osso, é mais comum o acometimento na região metafisária dos ossos longos. O sítio primário mais comum é a região da articulação do joelho, sendo que 60% dos casos originam-se nesta região anatômica. O fêmur distal (42%) e a tibia proximal (19%) são as áreas mais frequentemente acometidas, seguidas por úmero proximal (10%) e fêmur proximal (4%) (LINK et al. 2006). O esqueleto axial pode também ser acometido (< 10% dos casos no grupo pediátrico) ocorrendo mais comumente na pélvis. A mandíbula está acometida em menos de 7% dos casos de osteossarcoma (Figura1) (MARINA et al. 2004).



Legenda: articulação do joelho (60%), úmero proximal (10%), fêmur proximal (4%), pélvis (10%) e mandíbula (7%).

Figura 1 - Sítios anatômicos mais frequentes (percentuais aproximados) de osteossarcoma.

A etiologia do osteossarcoma permanece obscura. O pico de incidência do osteossarcoma coincide com a puberdade, um período de rápido crescimento ósseo, sugerindo uma correlação entre o estirão de crescimento observado nesta fase e a evolução do osteossarcoma (GELBERG et al. 1997). HAM et al. (1998) sugerem que o desenvolvimento do osteossarcoma esteja relacionado com o aumento dos níveis do hormônio de crescimento e IGF-1, ambos encontram-se aumentados durante a fase do estirão de crescimento. Segundo este autor, o rápido crescimento ósseo observado nesta fase torna os precursores osteogênicos susceptíveis a fatores oncogênicos, favorecendo erros mitóticos, rearranjos cromossômicos e transformação neoplásica.

De acordo com esta teoria, a maior incidência deste tumor em meninos pode ser explicada pelo maior crescimento ósseo observado neste sexo. O pico de incidência de osteossarcoma mais precoce observado em meninas (12,5 anos) quando comparado aos meninos (15 anos) também suporta esta teoria, pois as meninas apresentam o desenvolvimento e maturação do esqueleto mais precoce que os meninos (GELBERG et al. 1997). Porém, este fato ainda é controverso na literatura.

Alguns agentes químicos estão relacionados com o desenvolvimento do osteossarcoma. Alguns estudos realizados com animais sugerem que óxido de berílio atua como um fator iniciador do processo neoplásico (HOAGLAND et al. 1950). Em seres humanos os compostos químicos que se relacionam com um maior risco para o desenvolvimento de osteossarcoma são alguns agentes quimioterápicos, como ciclofosfamida,

ifosfamida, cisplatina, carboplatina e dacarbazida, entre outros. Este efeito dos agentes antineoplásicos ocorre independente do efeito sinérgico da radioterapia e do tipo tumoral prévio (FERRIS et al. 2005).

A radiação ionizante é um dos fatores de risco mais bem estudados para osteossarcoma. A radiação ionizante esta relacionada com 3% dos casos. O risco para o desenvolvimento de um sarcoma ósseo esta diretamente relacionada com a dose total de radiação administrada ao paciente. O período de latência entre a radiação e o desenvolvimento do tumor varia de 4 a 40 anos (FERRIS et al. 2005).

Algumas síndromes genéticas apresentam uma maior incidência para o desenvolvimento de osteossarcoma.

Aparentemente, existe um mecanismo comum na tumorigênese de retinoblastoma e osteossarcoma, o qual envolve uma mutação do gene *RB1* (FRIEND et al. 1987; SANDBERG et al. 2003). Pacientes com diagnóstico de retinoblastoma hereditário apresentam mutação do gene supressor de tumor *RB1* localizado no braço longo do cromossomo 13q14.3 das células germinais o que implica em um maior risco para o desenvolvimento de segundos tumores, sendo que o osteossarcoma representa mais de 50% deste grupo. Pacientes que recebem radioterapia externa em órbita para o tratamento de retinoblastoma apresentam um risco 2000 vezes maior de evoluírem com osteossarcoma na área irradiada do que o esperado na população geral, assim como um risco de 500 vezes maior de evoluírem com osteossarcoma em extremidades (áreas não irradiadas) (FERRIS et al. 2005).

Outra síndrome genética associada com maior frequência de desenvolvimento de osteossarcoma é a síndrome de Li-Fraumeni, caracterizada pela elevada frequência de tumores em idade precoce, dentre estes o osteossarcoma. O gene implicado no desenvolvimento desta síndrome é o gene *TP53* um gene supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 17p13.1. Estudos de *screening* envolvendo crianças com osteossarcoma revelam que 3-4% apresentam mutação germinativa no gene *TP53* (TOGUSHIDA et al. 1992; MCINTYRE et al. 1994). Diversas alterações no gene *TP53* foram observadas em amostras de osteossarcoma, tais como, mutações pontuais, rearranjos cromossômicos e perdas alélicas (TOGUSHIDA et al. 1992).

Outras síndromes genéticas associadas são síndrome de Rothmund-Thomson e Síndrome de Bloom. Estas síndromes caracterizam-se pela falha dos mecanismos de reparo de DNA, com maior predisposição para desenvolvimento de neoplasias (FERRIS et al. 2005).

Patologias pré-existentes também apresentam um risco maior para o desenvolvimento destes tumores ósseos. Doença de Paget ou osteíte deformante predis põem ao desenvolvimento de osteossarcoma em indivíduos idosos, sendo que aproximadamente 1-2% dos pacientes desenvolverão osteossarcoma. Outras patologias como displasia fibrosa, exostoses múltiplas, osteomielite crônica e cistos ósseos aneurismáticos apresentam um risco maior para o desenvolvimento de osteossarcomas (FUCHS et al. 2001).

Apesar de inúmeros estudos tentarem explicar a etiologia do osteossarcoma, como em todas as neoplasias, as evidências científicas sugerem que ocorra uma interação entre vários fatores endógenos e exógenos, porém muitos destes fatores e suas interações ainda são desconhecidos.

Os achados clínicos do osteossarcoma são inespecíficos e dependem da localização do tumor. A dor é o sintoma mais comum. Geralmente o paciente refere dor intensa com duração de semanas a meses. Pode-se encontrar associado ao sintoma álgico, sinais flogísticos como edema, aumento da temperatura e hiperemia, com importante aumento da vascularização local. O paciente pode apresentar limitação funcional da articulação acometida ou dificuldade de deambulação. Sintomas constitucionais, como perda ponderal e febre são menos comuns, sendo encontrados mais comumente em pacientes com doença disseminada (DORFMAN e CZERNIAK 1995).

Aproximadamente 15-20% dos pacientes apresentam metástases ao diagnóstico (MEYERS et al. 1997). A maioria das lesões metastáticas é encontrada em pulmão, correspondendo a 90% dos casos. Aproximadamente 10% dos pacientes apresentam metástases ósseas, com ou sem metástases pulmonares concomitantes.

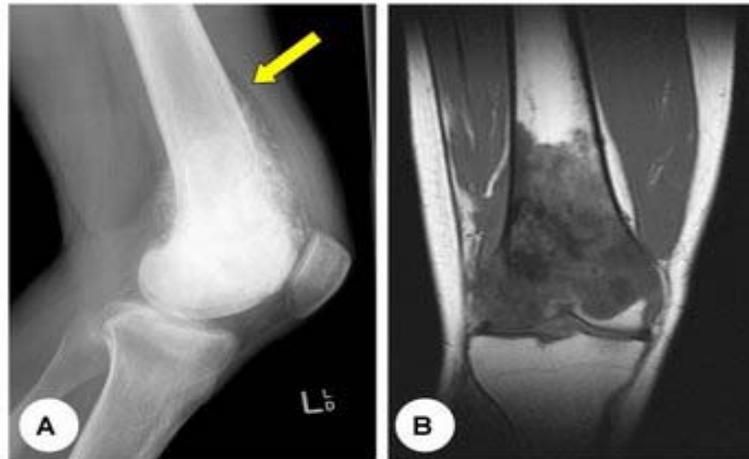
Os exames laboratoriais também são inespecíficos. Aumento dos níveis séricos de fosfatase alcalina e desidrogenase láctica é encontrado em 40% e 30% dos pacientes com diagnóstico de osteossarcoma,

respectivamente. Entretanto, não há um consenso na literatura sobre a correlação destes marcadores com extensão da doença (LINK et al. 2006).

Os exames de imagem são extremamente úteis na avaliação dos pacientes com suspeita de tumores ósseos. O raio-X simples revela a localização e o padrão destrutivo do trabeculado ósseo normal, com acometimento do espaço medular e do córtex e, muito freqüentemente com invasão de tecidos adjacentes e conseqüente calcificação (DORFMAN e CZERNIAK 1995).

Radiograficamente, o osteossarcoma pode apresentar-se como imagem esclerótica em 45% dos casos, lítica em 30% ou misto (esclerótico-lítico) em 25% dos casos. O crescimento do tumor pode levar a uma intensa reação periosteal com levantamento do periósteo e remodelamento do córtex, imagem conhecida como triângulo de Codman (LINK et al. 2006) (Figura 2).

Os sinais radiológicos são sugestivos, porem não patognomônicos de osteossarcoma. Outros exames radiológicos de extrema importância para avaliação inicial e planejamento cirúrgico são a tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética. A tomografia computadorizada é utilizada para avaliação da extensão local do tumor e avaliação de metástases pulmonares. A ressonância nuclear magnética tem superado a tomografia computadorizada na avaliação da extensão intraóssea tumoral e sua relação com estruturas vizinhas, como músculos, gordura, articulações e feixe vâsculo-nervoso, determinantes para o planejamento cirúrgico. A cintilografia óssea com tecnésio- 99 também é utilizada na avaliação inicial do tumor para avaliar a extensão intraóssea do tumor primário e presença de “skip-metastase” e/ou metástases ósseas a distância (MARINA et al. 2004).



Legenda: A – Raio X mostrando osteossarcoma de fêmur distal evidenciando o Triângulo de Codman (seta amarela). B – Ressonância Nuclear Magnética de um osteossarcoma de fêmur distal (visão sagital) mostrando comprometimento da medula óssea com destruição da cortical e invasão de tecidos adjacentes

Fonte: TAN et al. (2006)

Figura 2 - Exames de imagem de um paciente com osteossarcoma.

A história clínica e as avaliações laboratoriais e radiológicas são de extrema importância para o diagnóstico de osteossarcoma, porém a biópsia para a confirmação patológica é mandatória (MARINA et al. 2004).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o osteossarcoma pode ser classificado em osteossarcoma convencional (osteoblástico, condroblástico e fibroblástico), telangiectásico, parosteal, periosteal, pequenas células e multifocal (RAYMOND et al. 2002). Esta classificação é baseada no tipo de matriz predominante encontrada no tumor (TAN et al. 2006). O osteossarcoma convencional é o mais freqüente na faixa etária pediátrica. Destes, 50% são osteoblásticos, 25% condroblásticos e 25% fibroblásticos. Estes tumores são caracterizados por apresentarem

alto grau de malignidade. Alguns estudos que avaliam os fatores prognósticos em osteossarcoma não referem o subtipo histológico como um fator estatisticamente significativo (FORD et al. 2004; TAN et al. 2006). Outros estudos sugerem que o subtipo condroblástico apresenta-se menos responsivo a quimioterapia (LINK et al. 2006).

Embora não haja um consenso, algumas características clínicas dos pacientes com diagnóstico de osteossarcoma são sugeridas como fatores prognósticos. Segundo BACCI et al. (2006), pacientes com idade abaixo de 14 anos ao diagnóstico apresentam um pior prognóstico. Entretanto, no estudo de PETRILLI et al. (2006) a idade não foi identificada como fator prognóstico significativo. Tumores localizados em extremidades quando comparados com tumores localizados em esqueleto axial apresentam um melhor prognóstico (BIELACK et al. 2002). Em relação ao tamanho tumoral os estudos apresentam resultados discrepantes. BIELING et al. (1996) mostraram através de uma análise multivariada que tumores maiores de 150cm³ apresentaram pior sobrevida, enquanto que PETRILLI et al. (2006) mostraram que tumores maiores que 12cm apresentavam pior prognóstico.

A presença de metástases ao diagnóstico e o grau de necrose induzido pela quimioterapia pré-operatória são os fatores prognósticos mais significativos. Pacientes que apresentam metástases ao diagnóstico apresentam sobrevida muito inferior quando comparados com pacientes não metastáticos ao diagnóstico (LINK et al. 2006). Pacientes que apresentam mais que 90% de necrose após a quimioterapia pré-operatória (HUVOS III –

IV) apresentam sobrevida significativamente melhor do que pacientes com grau de necrose menor que 90% (HUVOS I – II) (CLARK et al. 2007).

O tratamento dos pacientes com osteossarcoma passou por muitas transformações nas últimas décadas. Hoje baseia-se em quimioterapia neoadjuvante, ressecção cirúrgica e quimioterapia adjuvante.

Até a década de 70 o tratamento do osteossarcoma baseava-se na ressecção cirúrgica do tumor primário e ou radioterapia. A sobrevida global em dois anos era de 15 – 20%. Oitenta a 90% dos pacientes apresentavam recaída local ou pulmonar, fazendo entender que estes pacientes já apresentavam micrometástases ao diagnóstico (MARINA et al. 2004). No início da década de 70 alguns estudos mostraram uma maior sobrevida global em 2 anos para aqueles pacientes que recebiam quimioterapia adjuvante (50%) quando comparados com pacientes submetidos apenas ao controle cirúrgico (15-20%) (HAM et al. 1998). No fim da década de 70 e início da década de 80, ROSEN et al. (1976) introduziram o conceito de quimioterapia neoadjuvante ou pré-operatória. A quimioterapia sistêmica pré-operatória propiciou um aumento do número de cirurgias conservadoras, facilitando a técnica cirúrgica e também a avaliação do grau de resposta à quimioterapia, avaliando assim a sua eficácia. Observou-se uma forte correlação entre o grau de necrose (HUVOS) e a sobrevida livre de recaída. Pacientes que apresentavam mais do que 90% de necrose (HUVOS III e IV) apresentavam uma sobrevida mais alta quando comparados com pacientes que apresentavam menos que 90% de necrose, isto é HUVOS I e II (ROSEN et al. 1976). Hoje em dia, com os esquemas atuais de quimioterapia

sistêmica, avanços nas técnicas cirúrgicas e melhora nos métodos diagnósticos de imagem, com maior sensibilidade para detecção das lesões metastáticas, os pacientes com tumores de extremidades, não metastáticas ao diagnóstico, apresentam uma sobrevida livre de eventos em 5 anos de 50% enquanto que esta taxa é de 15% para os pacientes metastáticos. Já a sobrevida global em 5 anos para pacientes não metastáticos encontra-se em torno de 70%, enquanto para pacientes metastáticos está em torno de 30% (BIELACK et al. 2002).

A necessidade de quimioterapia neoadjuvante e adjuvante já é bem estabelecida nos diferentes estudos, porém diferentes esquemas quimioterápicos são utilizados por diferentes instituições entretanto, a maioria dos esquemas atuais baseia-se em altas doses de metotrexate, doxorubicina e ou derivados de platina (BIELACK et al. 2008).

No Brasil também vivenciamos um progresso importante no diagnóstico e tratamento do osteossarcoma. Em 1980, iniciou-se um trabalho cooperativo com investigadores de diversos serviços hoje chamado Grupo Brasileiro para o Tratamento de Osteossarcoma cujos objetivos são obter informações detalhadas das características clínico-epidemiológicas da nossa população e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas considerando as características populacionais. Nestes 25 anos de experiência houve uma melhora significativa na sobrevida global. Anterior à década de 80 a sobrevida encontrava-se em torno de 10%. O primeiro estudo iniciado em 1982, resultou em uma sobrevida livre de eventos em 3 anos (EFS) de 44,1%. O segundo estudo conduzido entre 1987 – 1990

mostrou ESF em 3 anos de 65%, identificando tamanho do tumor primário, grau de necrose e tipo de cirurgia com fatores prognósticos relevantes (PETRILLI et al. 1991). O terceiro estudo iniciado em 1991 conduzido até 1996 e o quarto estudo conduzido de 1996 - 1999 resultaram em uma sobrevida global e livre de eventos de 60% e 45,5% em cinco anos, respectivamente (PETRILLI et al. 2006). Além disso, neste período, os avanços nas técnicas de cirúrgicas proporcionaram um aumento na taxa de cirurgia conservadora de membro de 59% para 70% (PETRILLI et al. 2006).

Apesar de todos os avanços obtidos com os métodos diagnósticos, no campo da quimioterapia e das técnicas cirúrgicas, a sobrevida global em 5 anos do osteossarcoma para pacientes não metastáticos permanece em torno de 70% e para pacientes metastáticos a sobrevida é de aproximadamente 20-30%.

Desta forma, os estudos hoje têm se voltado para um maior entendimento sobre a biologia do osteossarcoma.

1.2 GENÉTICA E OSTEOSSARCOMA

O desenvolvimento do osteossarcoma não tem sido relacionado com alterações genéticas características, todavia múltiplas e complexas alterações moleculares, com inúmeras alterações cromossômicas, inativação de genes supressores de tumor e amplificação de oncogenes tem sido descritas (GORLICK et al. 2003).

Estudos de citogenética clássica têm demonstrado que estes tumores apresentam um cariótipo complexo, caracterizado por alto grau de anormalidades cromossômicas, sejam estruturais ou numéricas. BATANIAN et al. (2002) avaliaram por citogenética clássica e hibridização genômica comparativa (CGH) 4 casos de osteossarcoma em crianças entre 3 e 13 anos. As anormalidades numéricas comumente encontradas incluem ganho do cromossomo 1, perda dos cromossomos 9, 10, 17, 19 e 22. Outras alterações numéricas descritas foram as monossomias do cromossomo 6, 8, 10, 16, 18 e 19, além da trissomia dos cromossomos 20 e 22. As alterações estruturais encontradas incluem rearranjos da região 1p11-13, 1q11, 4q27-33, 6p23-25, 6q16-25, 7p13-22, 7q11-36, 11p10-15, 11q23, 12p12, 17p11-13, 21p11 e 21q11-22. ZIELENSKA et al. (2001) analisaram 18 amostras de osteossarcoma por CGH e detectaram o ganho da região 1p35-p36 e do cromossomo 19 como as alterações mais freqüentes encontradas. DOS SANTOS-AGUIAR et al. (2007) analisaram 41 amostras de pacientes com osteossarcoma por CGH e identificou em 26 amostras perda do cromossomo 21, mais especificamente perda da região 21q11.2-21.

MARINA et al. (2004) descreveram outras anormalidades estruturais encontradas em osteossarcoma, as quais incluem ganho do cromossomo 1 e perda dos cromossomos 9, 10, 13 e 17, além da perda parcial ou completa do braço longo do cromossomo 6. Entre as anormalidades estruturais descritas encontram-se os rearranjos dos cromossomos 11, 19 e 20.

Os genes supressores de tumor *TP53* e *RB1* são genes sabidamente envolvidos na gênese do osteossarcoma. Entretanto, a perda de

heterozigose tem sido detectada em outros loci (3q, 13q, 17p, 18q), sugerindo a participação de outros genes supressores de tumor na patogênese do osteossarcoma (GORLICK et al. 2003).

Estudos de expressão gênica identificaram vários genes diferencialmente expressos em osteossarcoma. WOLF et al. (2000) analisaram o perfil de expressão gênica em três linhagens de osteossarcoma comparadas com linhagens de osteoblastos normais (doadores de medula óssea) através da técnica de cDNA microarray e encontraram quatro genes diferencialmente expressos. São eles *HSP90b*, *PABPLI*, *FNI* e *THBS1*. MINTZ et al. (2005) analisaram 30 amostras de osteossarcoma (15 amostras de paciente HUVOS I e II e 15 amostras de pacientes HUVOS III e IV) e identificaram a hiperexpressão dos genes *PLA2G2A*, *TGFB1*, *anexina2* e *SMAD* nas amostras de pacientes HUVOS I e II, sugerindo serem estes genes relacionados com quimiorresistência em osteossarcomas.

DALLA-TORRE et al. (2006) identificaram, através de experimentos de *cDNA array*, três genes diferenciamente expressos em 76 amostras de osteossarcoma obtidas no Instituto de Oncologia Pediátrica (IOP-GRAACC). De acordo com este estudo, a hiperexpressão do gene *THBS3* correlacionou-se com metástase ao diagnóstico ($p=0.058$) e com pior sobrevida livre de recaída ($p=0,003$). O gene *SPARC* foi encontrado hiperexpresso em 96% das amostras de osteossarcoma e apresentou correlação com pior sobrevida livre de eventos ($p=0,07$). O gene *SPPI* estava hiperexpresso em 89% das amostras de osteossarcoma e

apresentou correlação com melhor sobrevida global ($p=0,001$), sobrevida livre de eventos ($p=0,02$) e sobrevida livre de recaídas ($p=0,005$).

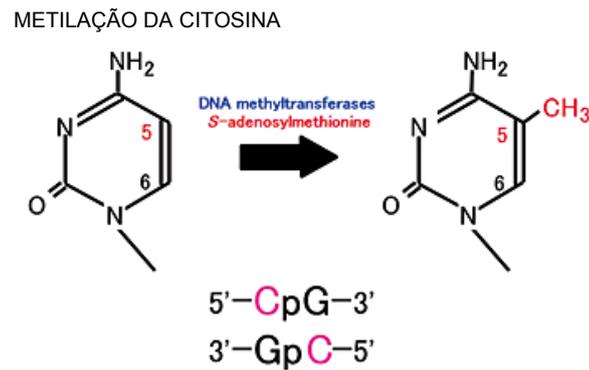
O aumento da expressão de *EGFR-2* também foi descrito em amostras de osteossarcoma (SANDBERG et al. 2003).

Estas anormalidades são extremamente diversas e variáveis, confirmando o complexo perfil de alterações cromossômicas presentes em osteossarcoma, o que dificulta a identificação de alterações específicas neste grupo de pacientes.

1.3 METILAÇÃO DE DNA

A metilação do DNA é a mais freqüente modificação química encontrada no genoma dos eucariotos. É considerada uma alteração epigenética, pois embora modifique a constituição química do DNA, ela não altera diretamente a seqüência de nucleotídeos (SULEWSKA et al. 2007).

A metilação envolve a ligação covalente de um radical metil (CH_3) à base nitrogenada citosina que precede uma guanina na seqüência do DNA (dinucleotídeo CpG), originando assim a 5-metil-citosina. Esta reação utiliza S-adenosil-metionina como doador do radical metil e é catalisada por enzimas chamadas DNA metiltransferase (DNMTs) (Figura 3).

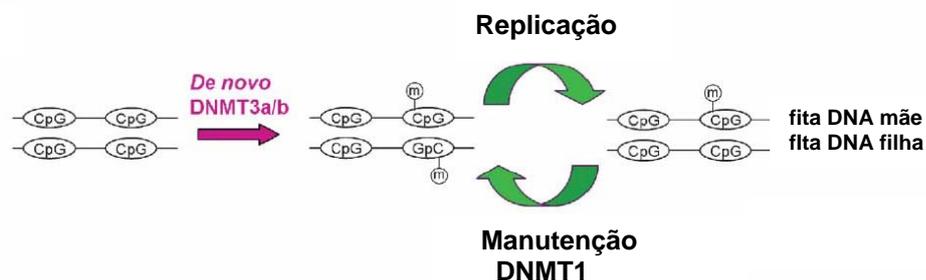


Legenda: A enzima DNA metiltransferase (DNMT) catalisa a metilação na posição 5 da citosina, utilizando S-adenosilmetionina como doador do grupo metil.

Fonte: Modificada de HERMAN e BAYLIN (2003).

Figura 3 - Metilação da citosina:

A família de DNMTs inclui DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. A enzima DNMT1 é responsável pela manutenção do padrão de metilação da célula mãe à célula filha e catalisa 97-99,9% das reações de metilação durante a mitose. As enzimas DNMT3a e DNMT3b são responsáveis pela adição de novos radicais metil ao DNA recém-sintetizado, processo conhecido como metilação *de novo*, com importância reconhecida nos processos iniciais do desenvolvimento embrionário (SULEWSKA et al. 2007) (Figura 4).



Legenda: DNMT3A/B catalisam reação de metilação em sítios não metilados previamente. Após cada replicação a manutenção do padrão de metilação às células filhas deve-se a enzima DNMT1.

Fonte: Adaptada de GRONBAEK et al. (2007).

Figura 4 - Propagação do modelo de metilação.

O dinucleotídeo CpG está presente em apenas 5-10% do genoma e encontra-se distribuído irregularmente. Estes dinucleotídeos CpG têm sido progressivamente eliminados do genoma provavelmente devido à instabilidade da metil-citosina, pois as citosinas metiladas apresentam uma maior propensão a se transformarem em timina através da deaminação hidrolítica (SINGAL et al. 1999).

Algumas regiões do genoma humano apresentam frequência aumentada destes nucleotídeos CG, as chamadas "ilhas CpG". Estas regiões estão localizadas na região promotora dos genes e representam aproximadamente 1 a 2% do genoma, com aproximadamente 0,5 kb de extensão e um conteúdo de citosinas e guaninas maior que 50%. Aproximadamente 50 a 60% dos genes possuem ilhas de CpG em suas regiões promotoras. Aproximadamente 80% dos dinucleotídeos CpG, os quais não estão associados com as ilhas CpG, encontram-se metilados. Em contraste, os dinucleotídeos localizados nas ilhas CpG encontram-se não metilados (HERMAN e BAYLIN 2003; GRONBAEK et al. 2007).

O papel da metilação do DNA é a regulação diferencial da expressão gênica (SINGAL et al. 1999).

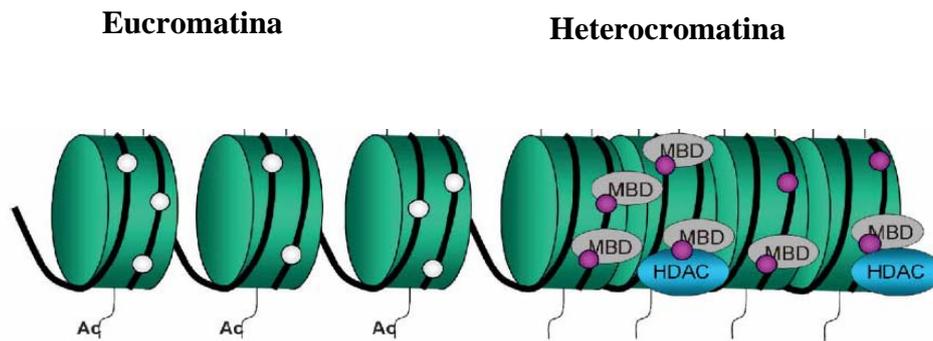
A metilação é um mecanismo fisiológico e tem um importante papel no desenvolvimento com a repressão transcricional de determinados genes, no *imprinting* genômico, na inativação de um cromossomo X nas mulheres e na proteção contra seqüências virais (LAIRD 2003; ROBERTSON 2005). O *imprinting* genômico determina que apenas um alelo do gene seja expresso

em tecidos normais, ou seja, para alguns genes o alelo paterno será expresso e para outros será o alelo materno (HERMAN e BAYLIN 2003).

Alguns possíveis mecanismos têm sido propostos para explicar a repressão transcricional pela metilação do DNA (SINGAL et al. 1999).

O primeiro mecanismo envolve a interferência direta da ligação dos fatores de transcrição na região promotora. Alguns fatores de transcrição reconhecem seqüências que contêm os dinucleotídeos CpG e quando a citosina encontra-se metilada há inibição da ligação dos fatores de transcrição. Porém alguns fatores de transcrição são insensíveis à metilação (SINGAL et al. 1999).

Outro potencial mecanismo para o silenciamento gênico induzido pela metilação é a ligação de proteínas específicas repressoras transcricionais à seqüência de DNA metilado. Estas proteínas, MeCP-1 e MeCP2 (methyl cytosine binding proteins 1 / 2) ligam-se a seqüência de DNA metilado. MeCP-2 é mais abundante que MeCP-1 (SINGAL et al. 1999). Estas proteínas apresentam um domínio de repressão transcricional que forma um complexo com moléculas co-repressoras (mSin3A) e proteínas histona-deacetilase (ESTELLER 2007). Quando este complexo se liga ao DNA metilado ocorre uma alteração na estrutura da cromatina, fazendo com que ela se torne mais condensada, dificultando o acesso dos fatores de transcrição (Figura 5). Assim ocorre o silenciamento gênico (STIRZAKER et al. 2003).



Legenda: Cromatina ativa transcricionalmente (euromatina) é caracterizada por citosinas não metiladas e histonas acetiladas. Cromatina inativa (heterocromatina) é caracterizada por metilação dos resíduos de citosina, com ligação das proteínas de ligação às metilcitosinas (MBD: MeCP-1 e MeCP-2) e das histonas desacetilases (HDAC). Assim a cromatina torna-se mais condensada e inacessível aos fatores de transcrição.

Fonte: Adaptada de GRONBAEK et al. (2007).

Figura 5 - Estrutura da cromatina ativa e inativa.

1.4 METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER

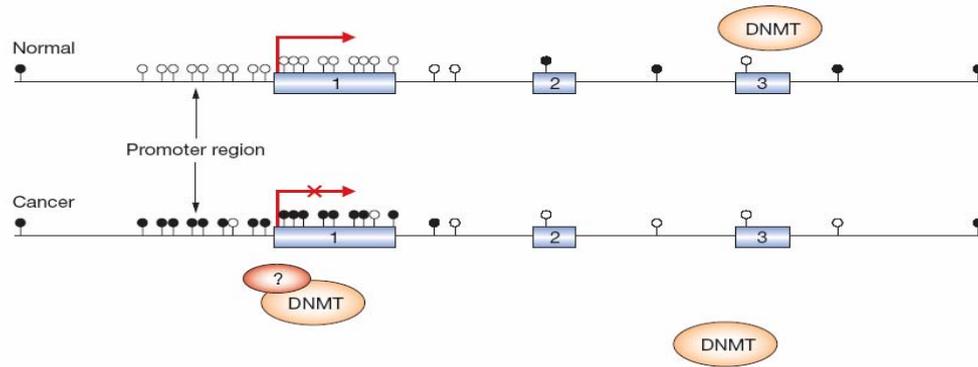
Diferentes alterações no perfil de metilação do DNA podem estar relacionadas com a carcinogênese. Em geral, as células neoplásicas são caracterizadas por apresentarem hipometilação em áreas normalmente metiladas e hipermetilação nas ilhas CpG, normalmente não metiladas em células normais (GRONBAEK et al. 2007) (Figura 6).

A perda de metilação do DNA pode levar a expressão de regiões normalmente silenciadas do genoma, sendo um achado comum na tumorigênese. A hipometilação pode levar à perda do *imprinting* de um dos alelos à transcrição de seqüências virais inseridas no DNA ou à expressão de microRNA oncogênicos. Além disso, a hipometilação do DNA facilita o surgimento de regiões genômicas instáveis, aumentando o potencial

oncogênico (GRONBAEK et al. 2007). Na síndrome hereditária de Beckwith-Wiedemann há a perda do *imprinting* de *IGF2* com aumento do risco de desenvolvimento de algumas neoplasias (ESTELLER 2008).

Em adição às mutações pontuais e deleções gênicas, a hipermetilação da região promotora dos genes supressores de tumor apresenta como consequência a repressão transcricional com inativação destes genes. Estes genes que apresentam hipermetilação da região promotora estão envolvidos com ciclo celular, reparo de DNA, metabolismo de carcinógenos, interação célula-célula, apoptose e angiogênese (ESTELLER 2000, 2008).

Eventos genéticos e epigenéticos podem levar à inativação de genes supressores de tumor. Em concordância com a hipótese de Knudson, para que ocorra a inativação do gene supressor de tumor ambos os alelos devem ser inativados (modelo dos dois eventos). Isso pode ocorrer por hipermetilação de ambos ou por uma combinação de deleção e hipermetilação. Em cânceres hereditários os eventos epigenéticos funcionam como o segundo evento para inativação de genes supressores de tumor, porém em cânceres esporádicos, a hipermetilação de ambas as cópias não é infreqüente (HERMAN e BAYLIN 2003). O gene do Retinoblastoma (*Rb*) foi o primeiro gene supressor de tumor no qual a hipermetilação da região promotora foi detectada (GRONBAEK et al. 2007). Outros genes supressores de tumor inativados por hipermetilação da região promotora são *VHL*, *MLH1*, *p16*, *BRCA1*, entre outros.



Legenda: Na figura A observamos o padrão de metilação em células normais. A região promotora do gene apresenta os dinucleotídeos CpG não metilados. Os dinucleotídeos CpG localizados fora da região promotora encontram-se metilados. Assim a transcrição do gene ocorre normalmente. Na figura B observamos que os dinucleotídeos da região promotora encontram-se hipermetilados o que causa a inibição da transcrição gênica.

Fonte: Adaptada de BAYLIN (2005).

Figura 6 - Distribuição dos dinucleotídeos CpG no genoma humano e diferenças do perfil de metilação entre células normais e neoplásicas.

1.5 METILAÇÃO E OSTEOSSARCOMA

Existem poucos estudos avaliando o padrão de metilação de neoplasias pediátricas. RATHI et al. (2003) demonstraram que o gene supressor de tumor *HIC1* encontra-se metilado em 36-80% das amostras de meduloblastoma, retinoblastoma, rabdomiossarcoma, tumor de células germinativas e neuroblastomas. Em um outro estudo, WONG et al. (2004) encontraram o gene *RASSF1A* metilado em 67% das 24 amostras de tumores pediátricos avaliadas, incluindo neuroblastoma, carcinoma de tireóide, hepatocarcinoma, pancreatoblastoma, carcinoma adrenocortical, tumor de Wilms, Linfoma de Burkitt e Linfoma de células T. Outros genes descritos como metilados em tumores pediátricos são *CASP8*, *TP53*,

CDKN2A, *CDKN2B*, *p14^{ARF}*, *RB1*, *CDH-1*, porém todos com grande variação entre os estudos. Talvez devido ao pequeno número de amostras analisadas, nenhum dos estudos obteve sucesso em estabelecer uma correlação válida entre o perfil de metilação e fatores prognóstico.

Poucos estudos até o momento avaliaram o padrão de metilação em osteossarcoma. TSUCHIYA et al. (2000) estudaram o perfil de metilação dos genes *CDKN2A*, *p14^{ARF}*, *CDKN2B* e *TP53* e diversas alterações (deleções, mutações pontuais) em 30 pacientes com diagnóstico de osteossarcoma e idade entre 6-55 anos. O gene *CDKN2A* mostrou-se alterado em 19% das amostras e destes, 40% correspondiam a metilação. O gene *CDKN2B* mostrou-se alterado em 14% das amostras e destes a metilação correspondia a 20%. Já o gene *p14^{ARF}* mostrou-se alterado em 9% das amostras, porém em nenhuma delas foi confirmada a metilação. BENASSI et al. (2001) estudaram 35 amostras de osteossarcoma e avaliaram os genes *CDKN2A* e *p14^{ARF}*. Em 60% das amostras o gene *CDKN2A* não foi expresso e em 57% ele encontrava-se metilado. LIM et al. (2003) estudaram o perfil de metilação do gene *RASSF1A* em 10 amostras de osteossarcoma primário e 6 linhagens de osteossarcoma. O gene *RASSF1A* estava metilado em 40% dos tumores primários e 83% das linhagens. Após 4 dias de tratamento com 5-aza-2-deoxicitidina, o gene *RASSF1A* passou a ser expresso em todas as linhagens celulares, indicando que a metilação seria o mecanismo responsável pelo silenciamento deste gene. PATIÑO-GARCÍA et al. (2002) avaliaram 41 amostras de osteossarcoma, encontrando os genes *CDKN2A* e *RB1* metilados em 12% e em 14% delas, respectivamente.

HOU et al. (2006) estudaram o perfil de metilação em 5 genes (*CDKN2A*, *RASSF1A*, *DAPK*, *MGMT*, *TIMP3*) em 30 amostras de osteossarcoma e seus correspondentes normais através de PCR quantitativa específica para metilação (Q-MSP) em pacientes com idade variável entre 4 e 51 anos. Os resultados indicam que os genes *RASSF1A*, *TIMP3*, *MGMT* e *DAPK* apresentaram diferença significativa de hipermetilação nas amostras tumorais quando comparados com o controle normal. Em adição, os resultados mostram que houve uma diferença significativa no nível de metilação do DNA entre os pacientes metastáticos e não metastáticos ($p < 0,01$).

O delineamento adequado do curso da doença, sua detecção precoce e a identificação de parâmetros que pudessem auxiliar na identificação de tumores metastáticos poderiam contribuir com o aumento da sobrevida dos pacientes, além de melhora da qualidade de vida. Além disso, fatores prognósticos sensíveis poderiam oferecer mais subsídios para a adequação das estratégias terapêuticas. A hipermetilação de promotores gênicos tem sido considerada um potencial marcador molecular para diagnóstico e prognóstico em vários tumores, como por exemplo, pulmão, mama e cólon (NUOVO et al. 1999; ESTELLER et al. 1999, 2000; BAYLIN et al. 2001; VAN RIJINSOEVER et al. 2002). Entretanto, existem poucos estudos avaliando o perfil de metilação em osteossarcomas e, talvez devido a pequena casuística avaliada, nenhum destes estudos conseguiu estabelecer uma correlação entre a hipermetilação e aspectos clinico-patológicos da doença.

Considerando a metilação como um importante mecanismo epigenético para o silenciamento de genes supressores de tumor, a avaliação do perfil de metilação de genes envolvidos com a tumorigênese do osteossarcoma pode ser útil como fator prognóstico, permitindo modificações na abordagem terapêutica e, com isso, melhorar as taxas de cura.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visou estabelecer a frequência de hipermetilação da região promotora de genes supressores de tumor em amostras de tumor fresco e congelado (biópsias) de pacientes pediátricos com diagnóstico de osteossarcoma, sem tratamento quimioterápico prévio, provenientes do Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo e do Instituto de Oncologia Pediátrica – UNIFESP e avaliar se o perfil de hipermetilação pode funcionar como um marcador molecular útil neste tipo tumoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Determinar o perfil de hipermetilação da região promotora de 18 genes supressores de tumor (*AIM1*, *APC*, *CALCA*, *CCNA1*, *CDH1*, *CDKN2A*, *DAPK*, *ESR1*, *GSTP1*, *HIC1*, *MLH1*, *p14^{ARF}*, *RAR β* , *RASSF1A*, *RB1*, *SOCS1*, *THBS1* e *SFRP1*) em amostras de osteossarcoma sem tratamento quimioterápico prévio.
- 2 Verificar se existe correlação entre o perfil de hipermetilação e fatores clínicos e histopatológicos, principalmente aqueles relacionados ao prognóstico, como a presença de metástases e grau de necrose induzido pela quimioterapia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram selecionadas amostras de tecido tumoral ósseo fresco e congelado provenientes de biópsias realizadas no momento do diagnóstico. Estas amostras pertenciam ao Banco de Tumores do Hospital AC Camargo, sob coordenação do Dr. Fernando Soares e do Banco de Tumores do Instituto de Oncologia Pediátrica – UNIFESP, sob coordenação da Dra. Silvia Toledo.

As amostras foram revisadas por um patologista para que houvesse confirmação do diagnóstico de osteossarcoma através da confecção de uma lâmina corada por hematoxilina-eosina proveniente da amostra obtida no banco de tumores.

Os dados clínicos dos pacientes foram extraídos dos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico (SAME) do serviço de origem. Foram abordados os seguintes critérios: data de nascimento, sexo, idade ao diagnóstico, data do diagnóstico, sítio primário do tumor, tipo histológico (biopsia pré operatória e peça cirúrgica), presença de metástases ao diagnóstico, grau de necrose induzido pela quimioterapia pré-operatória (Grau de HUVOS), recaída, *status* do paciente, data do último *follow-up*.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) em 17/02/05 e pelo Comitê

de Ética em Pesquisa (CEP) Fundação Antonio Prudente em 28/03/06 - SISNEP número 1336.0.022.174-06

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de tumor fresco com aproximadamente 1 cm³ foram pulverizadas em nitrogênio líquido para em seguida ser realizada extração de DNA utilizando-se o Reagente TRIZOL (Invitrogen[®]) conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Ao tecido pulverizado foi adicionado 1mL de TRIZOL. Após centrifugação (10 minutos a 12.000 rpm a 4° C) a fase aquosa foi removida e o RNA presente nela foi precipitado através da adição de etanol e armazenado a -70°C. À fase orgânica foram adicionados 500µL de tampão de extração (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 50mM e TRIS 1M pH 8,0 para cada 1 ml de TRIZOL utilizado no início da extração. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente, homogeneizando-as a cada 5 minutos. Em seguida foram centrifugadas por 15 minutos à 4°C 12.000 rpm. O sobrenadante (contendo o DNA) foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 1µL de glicogênio (20mg/mL) e 1 volume de isopropanol. As amostras foram então deixadas a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida, centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e foi adicionado 1mL de etanol 70% gelado, misturando-se por inversão e centrifugando-as novamente por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado e todas as

amostras foram secas a temperatura ambiente para em seguida, o DNA contido nos tubos ser ressuspensionado em 50µL água.

As amostras oriundas do Banco de Tumores do Instituto de Oncologia Pediátrica – UNIFESP foram processadas pelo grupo da Dra. Silvia Toledo e uma alíquota do DNA nos foi enviada

As amostras de foram quantificadas por espectrofotometria utilizando-se o equipamento *Nanodrop*.

Para verificar a qualidade e integridade do DNA foi realizada PCR utilizando-se *primers* para a amplificação de um fragmento de 283pb do gene *BRCA1* - éxon 11 (Tabela1)

Tabela 1- Seqüência dos primers direto e reverso para amplificação do fragmento de 283pb do gene *BRCA1* – exon 11.

Primer	Seqüência
<i>Direto</i>	5'-GAGAGGCATCCAGAAAAGTATCAG-3'
<i>Reverso</i>	5'-CACACAGGGGATCAGCATTTC-3'

Essa reação foi realizada sob as seguintes condições: 1 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,2µM de cada primer, 1X tampão de PCR, 1,0U de *Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* e 100ng de DNA em um volume final de reação de 25µl. O programa de PCR utilizado foi: 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 61°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; e um passo final a 72°C por 7 minutos. Para a visualização dos produtos amplificados as amostras foram resolvidas através de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.

3.3 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

O tratamento do DNA com bissulfito de sódio resulta na conversão das citosinas não metiladas em uracilas, não alterando as citosinas metiladas. As uracilas são convertidas em timinas durante a reação de amplificação. O DNA de cada uma das amostras foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio conforme descrito por Jerônimo et al. (2004). Basicamente, numa primeira etapa foi realizada a denaturação do DNA, utilizando 2 µg do DNA, 1 µL de *Hering Sperm DNA* 1 µg/ml (Invitrogen) e 2 µL de NaOH 3M para um volume final de 20 µL. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 50°C por 20 minutos. Em seguida foram adicionados às amostras 500 µL de solução de bissulfito de sódio (bissulfito de sódio 2,5M, hidroquinona 125mM e NaOH 350 mM). As amostras então foram incubadas no escuro a 70°C por 3 horas. O DNA foi purificado com a utilização do kit *Wizard DNA clean-up system* (PROMEGA) e, posteriormente, lavado com 4 mL de isopropanol 80%, seguida pela centrifugação das amostras por 3 minutos a 13000 rpm. O DNA tratado foi então eluído em 45 µL de água mili-Q a 80°C. A dessulfonação do DNA foi feita através da adição de 5 µL de NaOH 3M e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. A precipitação do DNA, foi realizada com a adição de 75 µL de acetato de amônia 5M, 300 µL de etanol 100% gelado e 1 µL de glicogênio (20mg/mL) e incubação *overnight* a -20°C. Após centrifugação (30 min., 12000rpm, 4°C) e descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 µL de álcool 70% gelado e repetidos os passos de centrifugação e descarte do

sobrenadante. Os *pellets* foram deixados à temperatura ambiente para sua secagem, ressuspensos em 110µL de água e armazenados a -70° C.

3.4 PCR QUANTITATIVA ESPECÍFICA PARA METILAÇÃO (QMSP)

O DNA extraído foi submetido a tratamento com bissulfito de sódio e posteriormente à MSP quantitativa (QMSP - *methylation specific PCR – polymerase chain reaction - MethyLight*) conforme descrição de EADS et al. (2000). A QMSP é uma abordagem quantitativa baseada na PCR em tempo-real. Nessa abordagem são utilizados um par de primers e uma sonda específica marcada com 2 fluoróforos: um *reporter* (6-carboxi-fluoresceína – FAM) na extremidade 5' e um *quencher* (6-carboxi-tetrametil-rodamina – TAMRA) na extremidade 3'. O *reporter*, quando excitado por um laser, emite fluorescência, a qual é captada pelo *quencher* devido à proximidade entre ambos. Durante a reação de PCR, a atividade de exonuclease da *Taq* DNA Polimerase hidrolisa a sonda, separando o *reporter* do *quencher*, e a fluorescência emitida pode, então, ser captada pelo aparelho. Portanto, o nível de fluorescência detectado pelo aparelho é proporcional à quantidade de produto amplificado formado durante a reação. A quantidade inicial de amostra pode ser inferida tendo como base o C_T , o qual representa o ciclo da PCR em que a quantidade de fluorescência produzida na reação atinge um limite pré-estabelecido. Para que as amostras possam ser quantificadas baseadas no C_T é necessária a construção de uma curva padrão, construída

a partir da diluição seriada de uma mesma amostra de DNA, na qual o C_T diminui linearmente de acordo com o aumento da quantidade de DNA. Os dados referentes à quantificação da amostra amplificada são calculados pelo próprio aparelho de PCR em tempo-real (BUSTIN 2000; EADS et al. 2000). Como referência interna das reações foi utilizada a amplificação do gene *ACTB*, cujos iniciadores e sondas foram desenhados em região livre de nucleotídeos CG, por isso, a amplificação do gene referência ocorre independentemente da presença ou ausência de metilação. Por outro lado, a amplificação dos genes-alvo depende da presença de metilação em seus promotores, pois os primers e sondas contemplam em suas seqüências a presença do dinucleotídeo CG (JERONIMO et al. 2001; HARDEN et al. 2003; JERONIMO et al. 2004b).

As reações de amplificação para o gene *ACTB* e para os genes alvo (*AIM1*, *APC*, *CALCA*, *CCNA1*, *CDH1*, *DAPK*, *ESR1*, *GSTP1*, *HIC1*, *p14^{ARF}*, *CDKN2A*, *RARB*, *RASSF1A*, *RB1*, *SOCS1*, *THBS1*, *SFRP1*, *MLH1*) foram realizadas em um volume total de 20 μ L contendo tampão *Home Made* 1X (sulfato de amônio 16,6mM, Tris-HCl pH 8,8 67mM, cloreto de magnésio 6,7mM, β -mercaptoetanol 10mM, DMSO 0,1%), 200 μ M de dNTP, 1,2 μ M de cada um dos primers, 200nM de sonda, 0,75 unidade de *Platinum Taq DNA Polimerase* (Invitrogen) e 3 μ L de DNA tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação foram: uma etapa inicial de denaturação a 95°C durante 2 minutos, seguida de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram preparadas em placas de 96 *wells* e todas as amostras foram analisadas em triplicatas no aparelho *7500 Real*

Time PCR System (Applied Biosystems). Para o gene *CDKN2A* a concentração de cloreto de magnésio no tampão *Home Made 1X* foi de 2,5mM.

Os primers e sondas utilizados neste estudo estão apresentados no Quadro 1.

Além das amostras, para cada reação foi construída uma curva padrão a partir da diluição seriada de uma mesma amostra de DNA. Nesse estudo, foi utilizado DNA de linfócitos metilados *in vitro*, através da ação da enzima *Methylase – SssI* (New England Biolabs) conforme instruções do fabricante, e submetido ao tratamento com bissulfito de sódio. Para a construção das curvas foram utilizados 6 pontos de diluição cujas concentrações foram 30ng; 3ng; 0,3ng; 0,03ng; 0,003ng e 0,0003ng.

Antes da realização das reações de QMSP foram verificadas as eficiências de amplificação de todos os conjuntos de iniciadores e sondas. Para tanto, foram construídas curvas padrão para cada um dos genes, incluindo o gene referência. Essas curvas foram construídas a partir de uma diluição seriada (como descrita acima) de uma mesma amostra de DNA de linfócitos metilados *in vitro*. Após a amplificação a eficiência foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$, onde E é a eficiência e *slope* é a inclinação da reta formada pelos pontos da curva padrão, este valor é fornecido pelo próprio aparelho de PCR em tempo-real.

Só foram consideradas as amostras onde foi possível detectar amplificação em pelo menos duas das triplicatas. A ausência de amplificação ou amplificação de apenas uma das triplicatas indicava amostras não

metiladas. Para os cálculos foram utilizadas as médias dos valores das triplicatas. As amostras foram consideradas metiladas quando o nível de metilação foi superior a 0,1 %.

O cálculo do nível de metilação foi realizado com base na quantificação das amostras determinada pela curva padrão. Para esse cálculo foi obtida a razão entre a quantidade de amostra amplificada para o gene alvo e para o gene *ACTB* que em seguida foi multiplicada por 100 (quantidade do gene alvo/quantidade do gene *ACTB* X 100), gerando dados percentuais (HARDEN et al. 2003; JERONIMO et al. 2004a).

Quadro 1 - Sequência de primers e sondas

Gene	Forward 5'-3'	Probe 6FAM 5'-3' TAMRA	Reverse 5'-3'	Reference
<i>ACTB</i>	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	ACCACCACCCAAACACACAATAACAAACACA	AACCAATAAAACCTACTCTCCCTTAA	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
<i>AIM1</i>	CGCGGGTATTGGATGTTAGT	GGGAGCGTTGCGGATTATTCGTAG	CCGACCCACCTATACGAAAA	Carvalho et al. (2008) Clin Cancer Res 14: 97-107
<i>APC</i>	GAACAAAACGCTCCCAT	CCCGTCGAAAACCCGCGGATTA	TTATATGTCGGTTACGTGCGTTTATAT	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
<i>CALCA</i>	GTTTTGGAAGTATGAGGGTGACG	ATTCCGCCAATACACAACAACCAATAAACG	TTCCCGCCGCTATAAATCG	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
<i>CCNA1</i>	TCGCGCGGAGTTTATTCG	CGTTATGGCGATGCGGTTTCGG	CCGACCGCGACAAACG	Carvalho et al. (2008) Clin Cancer Res 14: 97-107
<i>CDH1</i>	AATTTTAGTTAGAGGGTTATCGCGT	CGCCACCCGACCTCGCAT	TCCCAAAACGAAACTAACGAC	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-9
<i>CDKN2A</i>	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	AGTAGTATGGAGTCGGCGGGGG	GACCCCGAACCGGACCGTAA	Harden et al. (2003) Clinical Cancer Res 9:1370-1375
<i>DAPK</i>	GGATAGTCGGATCGATTAACGTC	TTCGGTAATTCGTAGCGGTAGGTTTGG	CCCTCCAAACGCCGA	Harden et al. (2003) Clinical Cancer Res 9:1370-1375
<i>ESR1</i>	GGCGTTCGTTTTGGGATTG	CGATAAAACCGAACGACCCGACGA	GCCGACACCGGAACTCTAA	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
<i>GSTP1</i>	AGTTGCGCGCGATTTCC	CGGTCGACGTTCCGGGTGTAGCG	GCCCAATACTAAATCACGACG	Jeronimo et al. (2001) J Nat Cancer Inst 93:1747-1752
<i>HIC1</i>	GTTAGGCGGTTAGGGCGTC	CAACATCGTCTACCCAACACTCTCCTACG	CCGAACGCCTCCATCGTAT	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
<i>MLH1</i>	CGTTATATATCGTTCGTAGTATTCGTGTTT	CGCGACGTCAAACGCCACTACG	CTATCGCCCGCTCATCGT	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
<i>P14^{ARF}</i>	ACGGGCGTTTTTCGGTAGTT	CGACTCTAACCCCTACGCACGCGAAA	CCGAACCTCCAAAATCTCGA	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
<i>RARB</i>	GGGATTAGAATTTTTATGCGAGTTGT	TGTCGAGAACCGGAGCGATTCCG	TACCCCGACGATACCCAAAC	Hoque et al. (2005) J Clin Endocrinol Metab 90:4011-18
<i>RASSF1A</i>	GCGTTGAAGTCGGGGTTC	ACAAAACGGAACCGAACGAAACCA	CCCGTACTTCGCTAACTTTAAACG	Lehmann et al. (2002) Am J Pathol 160:605-612
<i>RB1</i>	TTAGTTCGCGTATCGATTAGCG	TCACGTCCGCGAAACTCCCGA	ACTAAACGCCGCTCCAA	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8
<i>SFRP1</i>	GAATTCGTTCCGAGGGA	CCGTCACCGACGCGAAAACCAAT	AAACGAACCGCACTCGTTACC	Weisenberger et al. (2006) Nature Genet 38(7):787-94
<i>SOCS1</i>	GCGTCGAGTTCGTGGGTATTT	ACAATTCGCTAACGACTATCGCGCA	CCGAAACCATCTTCAGCTAA	Müller et al. (2003) Cancer Res 7641-7645
<i>THBS1</i>	CGACGCACCAACCTACCG	ACGCCGCGCTCACCTCCCT	GTTTTGAGTTGGTTTTACGTTCTGTT	Eads et al. (2001) Cancer Res 61:3410-8

3.5 METILAÇÃO IN VITRO DE DNA DE LINFÓCITOS

Para a construção das curvas padrão utilizada na reação de *methylation-specific PCR quantitativa (QMSP)* foi utilizado DNA de linfócitos metilados *in vitro*. Após extração de linfócitos de sangue periférico de indivíduos saudáveis, adicionou-se 20µg de DNA de linfócitos a 0,032mM de S-adenosilmetionina (SAM) e 25 unidades da enzima *SssI CpG Methylase* (New England Biolabs). O volume final da reação foi de 250µL. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C. Em seguida, adicionou-se 0,064mM de S-adenosilmetionina e 12,5 unidades de *SssI CpG Methylase* e novamente as amostras foram incubadas por 4 horas a 37°C. Após esta fase foi realizada a extração do DNA através da adição de 250µL de fenol-clorofórmio e em seguida a precipitação através da adição de 625 µL de etanol 100%. O pellet de DNA foi dissolvido em 15µL de água e estocado a -70°C.

O DNA de linfócitos metilado foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio conforme descrição anterior e então utilizado na construção das curvas padrão.

3.6 ESCOLHA DOS GENES

Todos os genes selecionados para estes estudo já foram descritos descritos como hipermetilados em outros tipos de neoplasias humanas.

Os genes *RASSF1A* e *DAPK* estão envolvidos com apoptose, enquanto *CDKN2A*, *p14^{ARF}*, *RB1*, *CCNA1* e *SOCS* com controle do ciclo

celular. Alguns genes estão envolvidos com regulação da transcrição gênica como *AIM1* e *HIC1* ou com o reparo de DNA (*MLH1*). Os genes *CALCA*, *ESR1* e *RAR β* estão envolvidos com sinalização célula-célula. O gene *GSTP1* está envolvido com o processo de detoxificação e mediação de resposta inflamatória. O gene *THBS1* está relacionado com invasão e capacidade de metástase em alguns tumores, enquanto que o gene *SFRP1* está relacionado com diferenciação celular e o *CDH1* com adesão celular. O gene APC é um gene supressor tumoral.

Os genes *RASSF1A*, *HIC1*, *DAPK*, *CDKN2A*, *p14^{ARF}* e *RB1* já haviam sido descritos como hipermetilados em amostras de osteossarcoma, entretanto, há uma grande variação no tamanho das casuísticas destes estudos e na frequência de metilação encontrada, por isso, estes genes foram incluídos e avaliados neste estudo.

O estudo publicado por WOLF et al. (2000) utilizando cDNA microarray para avaliar a expressão gênica em linhagens de osteossarcoma demonstrou que o gene *THBS1* encontrava-se hipoexpresso em todas as amostras avaliadas. O gene *THBS1* já foi descrito como frequentemente metilado em outros tumores (ESTELLER 2003), mas ainda não foi avaliado em osteossarcoma, por isso ele foi incluído neste estudo

Os genes *MLH1*, *CALCA*, *AIM*, *SFRP1*, *ESR1*, *CCNA1*, *APC*, *RAR β* , *GSTP1*, *SOCS-1* e *CDH1* já foram descritos como estando frequentemente metilados em diversas neoplasias, como tumores do sistema nervoso central, linfomas, mama, cólon, pulmão, próstata, fígado e rim (ESTELLER

2003). Estes genes, ainda não foram avaliados em osteossarcoma e, por isso, também foram incluídos neste estudo.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico *SPSS 13.0 for Windows*.

Para comparação dos dados clínicos e freqüências de metilação, para cada gene entre os pacientes tratados nas duas instituições, foram utilizados os testes de Qui-quadrado e exato de Fischer. Todas as características clínicas analisadas foram transformadas em variáveis categóricas. As características clínicas analisadas incluem: idade (< ou > 12 anos), sítio primário (fêmur ou outros), tipo histológico (osteoblástico ou outros), grau de HUVOS (bons respondedores (III e IV) ou pobres respondedores (I e II))

A avaliação da correlação entre a presença de hipermetilação para cada gene e as variáveis clínicas foi realizada utilizando-se todo o grupo de pacientes e aplicando-se os testes estatísticos de qui-quadrado e exato de Fischer.

A sobrevida global de todo o grupo foi avaliada pelo método de Kaplan-Meier e comparada através do log-rank

A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA

Inicialmente foram incluídas no estudo 60 amostras de tumor ósseo fresco e congelado (biópsias) colhidas no momento do diagnóstico, sendo 50 eram provenientes do Instituto de Oncologia Pediátrica – UNIFESP e 10 amostras foram obtidas junto ao Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo. Destas 60 amostras, foi possível recuperar DNA de qualidade satisfatória de 34 casos (24 provenientes do IOP e 10 provenientes do Hospital A.C. Camargo), e estes prosseguiram no estudo.

A idade dos pacientes avaliados variou de 7 a 29 anos, com média de 14 anos. Dezoito pacientes eram do sexo feminino (52,9%). O local primário mais frequentemente acometido foi o fêmur (52,9%), seguido por tíbia (26,5%), úmero (8,8%) e fíbula (5,9%). 29,4 % dos pacientes eram metastáticos ao diagnóstico. O tipo histológico mais comum foi osteoblástico (61,8%), seguido por condroblástico (17,6%) e telangiectásico (5,9%). Em relação ao grau de necrose (Grau de HUVOS), avaliado na peça cirúrgica após quimioterapia neoadjuvante, 29,4% dos pacientes foi classificados como HUVOS I (menos que 50% de necrose tumoral), 29,4% eram HUVOS II (51% - 90% de necrose), 20,6% eram HUVOS III (90-99% de necrose) e 20,6% eram HUVOS IV (100% de necrose). 52,9 % dos pacientes apresentaram recidiva da doença, sendo que 33% dos pacientes apresentaram recidiva

local e pulmonar combinadas, 16% só recidiva local isolada, 40% recidiva pulmonar isolada e 11% recaída óssea em local diferente do sítio primário (dados não mostrados). 67,6% dos pacientes estavam vivos no último *follow-up* (Tabela 2).

A sobrevida global em 5 anos para o grupo foi de 64% (Figura 7). Pacientes metastáticos ao diagnóstico apresentaram uma sobrevida global em 5 anos de 16%, os pacientes não metastáticos apresentaram uma sobrevida global em 5 anos de 86% ($p=0,001$) (Figura 8). Os pacientes que apresentaram recidiva do tumor após o tratamento quimioterápico de primeira linha apresentaram uma sobrevida global em 5 anos de 40%, já os pacientes que não apresentaram recidiva apresentaram uma sobrevida em 5 anos de aproximadamente 90% ($p= 0,024$) (Figura 9). Os pacientes que foram classificados como grau de HUVOS I apresentaram sobrevida global em 5 anos de 40%, para os grupos II, III e IV foram 77%, 64% e 100% respectivamente ($p=0,032$) (Figura 10).

Sítio primário ($p=0,054$), tipo histológico ($p=0,06$), sexo ($p=0,184$) e idade ($p=0,648$) não foram variáveis que apresentaram impacto estatístico na sobrevida (Figuras 11, 12, 13 e 14 respectivamente).

Tabela 2 - Características clínicas e histológicas dos pacientes incluídos no estudo.

Variável	Categoria	N	%
Sexo	feminino	18	52,9
	masculino	16	47,1
Idade	média	13,5	
	mediana	14	
Sítio Primário	fêmur	18	52,9
	tíbia	9	26,5
	fíbula	2	5,9
	úmero	3	8,8
	outros	2	5,9
Metástase	sim	10	29,4
	não	24	70,6
Tipo Histológico	osteoblástico	21	61,8
	condroblástico	6	17,6
	telangiectásico	2	5,9
	não avaliado	5	14,7
HUVOS	I	10	29,4
	II	10	29,4
	III	7	20,6
	IV	7	20,6
Recidiva	sim	18	52,9
	não	16	47,1
Status	vivo	23	67,6
	óbito	11	32,4

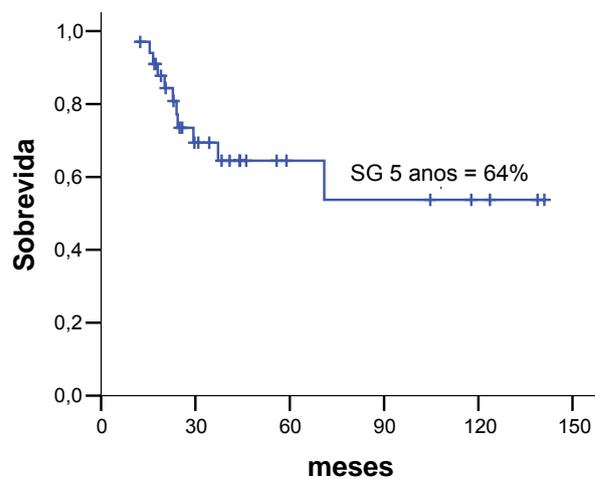


Figura 7 - Sobrevida Global em 5 anos do grupo de 34 pacientes incluídos no estudo.

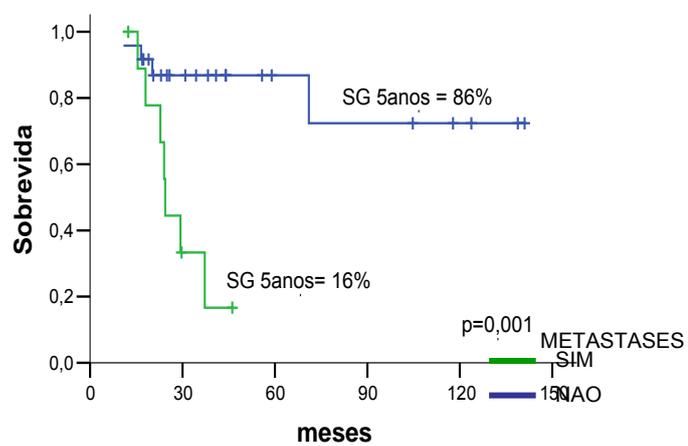


Figura 8 - Sobrevida Global em 5 anos em relação à presença de metástase ao diagnóstico (não metastático = 86% x metastático = 16%).

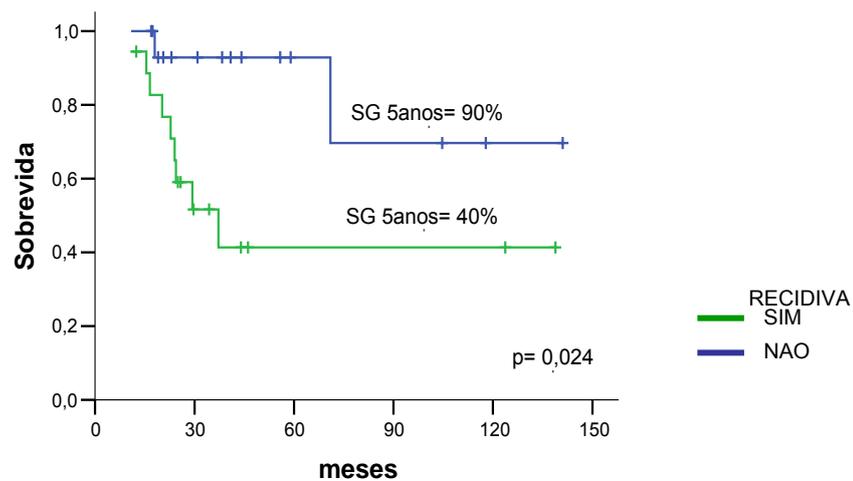


Figura 9 - Sobrevida global em 5 anos em relação à recidiva tumoral após o tratamento quimioterápico de primeira linha (sem recidiva = 90% x com recidiva = 40%)

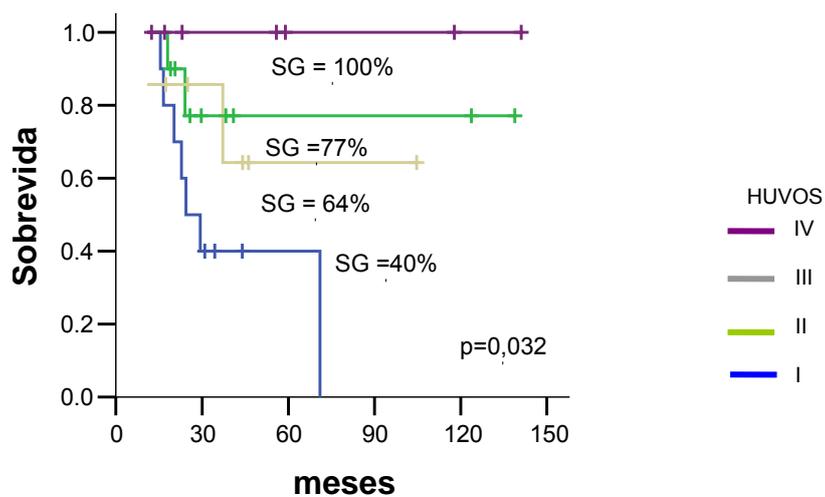


Figura 10 - Sobrevida global em 5 anos em relação ao grau de Necrose – (Huvos) (I = 40% , II = 77%, III = 64% e IV = 100%).

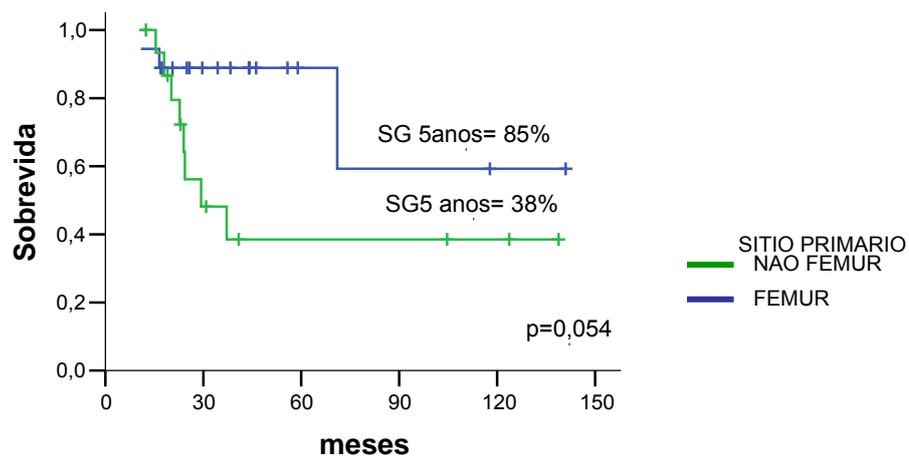


Figura 11 - Sobrevida global em 5 anos em relação ao sítio primário (fêmur = 85% x outros sítios = 38%)

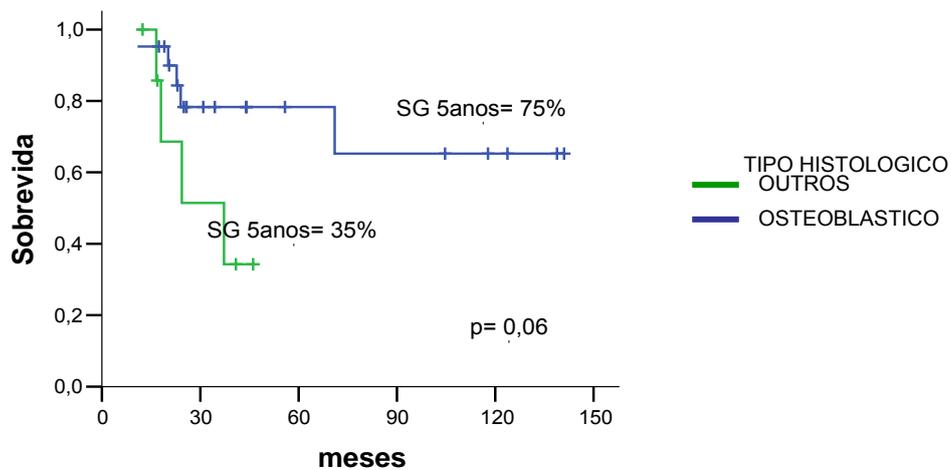


Figura 12 - Sobrevida global em 5 anos em relação ao tipo Histológico (osteoblástico = 75% x outros = 35%).

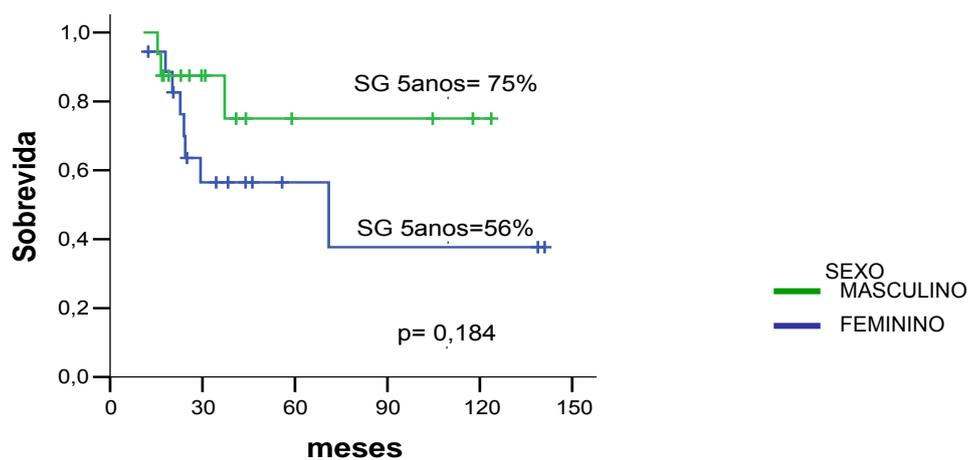


Figura 13 - Sobrevida global em 5 anos em relação ao sexo (feminino = 56% x masculino = 75%)

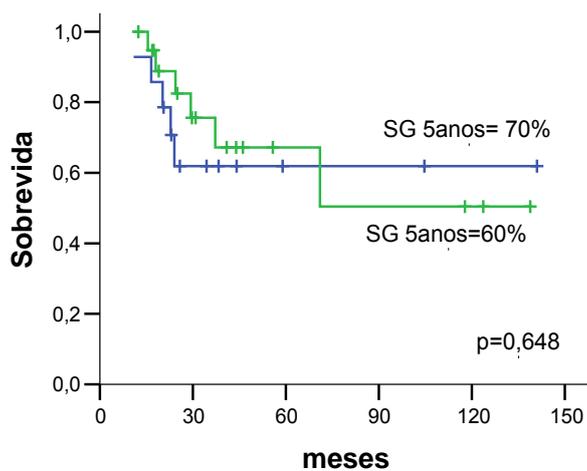


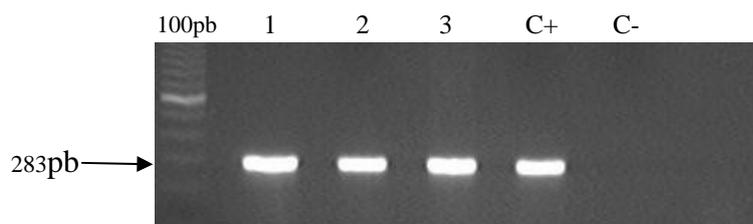
Figura 14 - Sobrevida global em 5 anos em relação a idade (> 12 anos = 70% x < 12 anos = 60%)

4.2 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

As 50 amostras oriundas do Banco de Tumores do Instituto de Oncologia Pediátrica (IOP) foram extraídas por aquele grupo, enquanto que as 10 amostras do Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo foram extraídas no âmbito deste estudo.

Das amostras do Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo obtivemos entre 1µg e 25 µg de DNA. Das amostras provenientes do IOP, 17 amostras apresentaram mais de 2 µg de DNA, 4 amostras apresentaram entre 1-2µg e 29 amostras apresentaram quantificação inferior a 1µg de DNA (Quadro 2).

A integridade dos DNAs de todas as amostras foi avaliada através da amplificação de um fragmento de 283pb do gene *BRCA-1* (exón 11) (Figura 15)



Legenda: Canaletas 1, 2, 3 com amostras tumorais. C+ : controle positivo (DNA genômico de linhagem celular). C - controle negativo (ausência de DNA).

Figura 15 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio com fragmentos de 283pb amplificados do gene *BRCA1*.

Todas as amostras provenientes do Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo apresentaram amplificação, atestando a integridade do DNA extraído. Das amostras provenientes do Banco de tumores do IOP apenas 48% das amostras amplificaram e puderam prosseguir no estudo (Quadro 2).

Quadro 2 - Quantidade de DNA obtida de cada amostra incluída no estudo e avaliação de sua qualidade através da amplificação de um fragmento de 283pb do gene *BRCA1*.

Amostras	Procedência	Quantificação	Amplificação
1	HAC	6,0µg	Sim
2	HAC	25,0µg	Sim
3	HAC	14,0µg	Sim
4	HAC	10,0µg	Sim
5	HAC	15,0µg	Sim
6	HAC	11,0µg	Sim
7	HAC	5,0µg	Sim
8	HAC	5,0µg	Sim
9	HAC	1,0µg	Sim
10	HAC	1,0µg	Sim
11	IOP	1,2µg	Sim
12	IOP	1,3µg	Sim
13	IOP	0,6µg	Não
14	IOP	0,1µg	Sim
15	IOP	0,3µg	Não
16	IOP	0,5µg	Não
17	IOP	0,5µg	Não
18	IOP	0,8µg	Não
19	IOP	0,5µg	Não
20	IOP	1,2µg	Sim
21	IOP	1,2µg	Sim
22	IOP	0,4µg	Não
23	IOP	0,1µg	Não
24	IOP	0,4µg	Não
25	IOP	2,6µg	Sim
26	IOP	2,0µg	Sim
27	IOP	3,6µg	Sim
28	IOP	0,4µg	Não
29	IOP	1,5µg	Sim
30	IOP	1,2µg	Sim
31	IOP	1,7µg	Sim
32	IOP	2,0µg	Não
33	IOP	1,6µg	Sim
34	IOP	0,3µg	Não
35	IOP	0,7µg	Não
36	IOP	0,6µg	Não
37	IOP	0,5µg	Não

Cont/ Quadro 2

38	IOP	0,6µg	Não
39	IOP	1,5µg	Sim
40	IOP	0,1µg	Não
41	IOP	0,2µg	Não
42	IOP	0,2µg	Não
43	IOP	2,3µg	Não
44	IOP	0,8µg	Sim
45	IOP	0,5µg	Não
46	IOP	3,0µg	Sim
47	IOP	0,7µg	Sim
48	IOP	1,9µg	Sim
49	IOP	0,5µg	Não
50	IOP	0,8µg	Sim
51	IOP	0,7µg	Sim
52	IOP	3,6µg	Sim
53	IOP	0,7µg	Não
54	IOP	1,0µg	Sim
55	IOP	0,5µg	Não
56	IOP	0,6µg	Não
57	IOP	2,0µg	Sim
58	IOP	0,8 µg	Não
59	IOP	0,6 µg	Sim
60	IOP	2,5 µg	Sim

HAC – Hospital A. C. Camargo, IOP – Instituto de Oncologia Pediátrica /UNIFESP-GRAACC

Para se detectar eventuais vieses de seleção de amostra, a população total inicial de 60 casos de osteossarcoma foi comparada com a população selecionada de 34 casos. Esta análise demonstrou que, a população selecionada não difere estatisticamente da população total do estudo quando consideradas as variáveis categóricas (sexo, sítio, tipo histológico, presença de metástases ao diagnóstico, grau de necrose – HUVOS e recidiva) e não-categóricas (idade) (Tabela 3). A sobrevida global nos dois grupos também não apresentou diferença estatisticamente significativa (população total (n=60) =74% x população selecionada (n=34) =64,5% p=0,184).

Tabela 3 - Análise comparativa entre a população total de 60 casos de osteossarcoma e a população selecionada de 34 casos .

	Características	População total n=60	Amostras do estudo n=34	p*
idade	< 12 anos	20	14	0,294
	> 12 anos	40	20	
sexo	feminino	30	18	0,477
	masculino	30	16	
sítio	fêmur	35	18	0,385
	outros	25	16	
tipo histológico	osteoblastico	38	21	0,527
	outros	16	8	
metástase	não	43	24	0,546
	sim	17	10	
Huvos	I e II	34	20	0,391
	III e IV	19	14	
	Não avaliados	7	0	
recidiva	não	32	16	0,570
	sim	28	18	
TOTAL		60	34	

*log-rank

4.3 ANALISES DE HIPERMETILAÇÃO EM OSTEOSSARCOMA

4.3.1 Estudo Piloto

Devido ao pequeno número de amostras que conseguimos incluir no estudo e à escassez de DNA obtido destas amostras optamos por realizar um estudo piloto, cujo desenho consistiu em determinar o perfil de metilação dos 18 genes selecionados em 13 amostras de osteossarcoma através da reação de QMSP. Estas amostras foram selecionadas de acordo a quantidade de DNA disponível, sendo analisadas nesta fase aquelas em que foram obtidos pelo menos 6µg de DNA.

Para se detectar eventuais vieses de seleção de amostra, a população total de 34 casos de osteossarcoma foi comparada com a população selecionada de 13 casos analisados no estudo piloto. Esta análise demonstrou que, a população total não parece diferir estatisticamente da sub-população analisada no estudo piloto quando consideradas as variáveis categóricas (sexo, sítio, tipo histológico, presença de metástases ao diagnóstico, grau de necrose – HUVOS e recidiva) e não-categóricas (idade) (Tabela 4). A sobrevida global nos dois grupos também não apresentou diferença estatisticamente significativa (população total (n=34) =64,5% x população selecionada para piloto (n=13) =80,0% p=0,293).

Tabela 4 - Análise comparativa entre a população total de 34 casos de osteossarcoma incluída no estudo e a população selecionada de 13 casos analisados no estudo piloto

	Características	População total n=34	Estudo piloto n=13	p*
idade	< 12 anos	14	4	0,379
	> 12 anos	20	9	
sexo	feminino	18	6	0,464
	masculino	16	7	
sítio	fêmur	18	7	0,608
	outros	16	6	
tipo histológico	osteoblástico	21	10	0,538
	outros	8	3	
metástase	não	24	11	0,277
	sim	10	2	
Huvos	I e II	20	8	0,568
	III e IV	14	5	
	Não avaliados			
recidiva	não	16	7	0,464
	sim	18	6	
TOTAL		34	13	

*log-rank

O estudo piloto permitiu a classificação dos 18 genes avaliados em 3 grupos: No grupo 1, genes freqüentemente hipermetilados (com freqüência de hipermetilação superior a 30%), foram classificados o *HIC1* (92,0%), *CDH1* (76%), *CALCA* (76%), *SFRP1* (61,5%), *p14^{ARF}* (61,5%), *ESR1* (30,7%) e *AIM1* (30,7%). No grupo 2, genes com baixa freqüência de hipermetilação (até 29%) encontram-se os genes *APC* (23,0%), *SOCS1* (23,0%), *MLH1*(23%), *RAR β* (15,3%) e *RASSF1A* (7,6%). No grupo 3 estão os genes *CDKN2A*, *CCNA1*, *GSTP1*, *THBS1*, *RB1* e *DAPK* que não apresentaram hipermetilação nas amostras de osteossarcoma avaliadas (Tabela 4).

Após análise dos resultados do estudo piloto, foram selecionados os 7 genes que estavam hipermetilados em pelo menos 30% das amostras analisadas (*AIM1*, *CALCA*, *CDH1*, *ESR1*, *HIC1*, *p14^{ARF}* e *SFRP1*) para prosseguir no estudo e serem avaliados nas demais 21 amostras de osteossarcoma incluídas no estudo.

Tabela 5 - Frequência de hipermetilação dos 18 genes avaliados nas 13 amostras de osteossarcoma incluídas no estudo piloto.

Genes	Estudo piloto n (%)
<i>HIC1</i>	12 (92,0%)
<i>CDH1</i>	10 (76,0%)
<i>CALCA</i>	10 (76,0%)
<i>SFRP1</i>	8 (61,5%)
<i>p14^{ARF}</i>	8 (61,5%)
<i>AIM1</i>	4 (30,7%)
<i>ESR1</i>	4 (30,7%)
<i>MLH1</i>	3 (23,0%)
<i>APC</i>	3 (23,0%)
<i>SOCS</i>	3 (23,0%)
<i>RARβ</i>	2 (15,3%)
<i>RASSF1A</i>	1 (7,6%)
<i>CDKN2A</i>	0 (0,0%)
<i>CCNA1</i>	0 (0,0%)
<i>GSTP1</i>	0 (0,0%)
<i>RB1</i>	0 (0,0%)
<i>DAPK</i>	0 (0,0%)
<i>THBS1</i>	0 (0,0%)

4.3.2 Análise Total

Analisando as 34 amostras em conjunto, as freqüências de hipermetilação dos 7 genes selecionados foram: *CALCA* (79,4%), *SFRP1* (76,5%), *HIC1* (76,5%), *CDH1* (61,8%), *AIM1* (38,2%), *p14^{ARF}* (23,5%), e *ESR1* (14,7%) (Tabela 5)

Tabela 6 - Freqüência de hipermetilação dos 7 genes avaliados nas 34 amostras de osteossarcoma.

Genes	Análise Total n(%)
<i>CALCA</i>	27 (79,4%)
<i>HIC1</i>	26 (76,5%)
<i>SFRP1</i>	26 (76,5%)
<i>CDH1</i>	21 (61,8%)
<i>AIM1</i>	13 (38,2%)
<i>p14^{ARF}</i>	8 (23,5%)
<i>ESR1</i>	5 (14,7%)

4.4 CORRELAÇÃO ENTRE HIPERMETILAÇÃO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

O perfil de hipermetilação obtido para os 7 genes foi correlacionados com as características clinico-patologicas dos 34 pacientes incluídos no estudo.

A hipermetilação do gene *CDH1* apresentou uma associação significativa com a idade ao diagnóstico maior que 12 anos ($p= 0,03$) (Tabela

6). O gene $p14^{ARF}$ quando hipermetilado apresentou associação significativa com a ausência de metástases ($p=0,04$) (Tabela 12).

Não foi possível detectar nenhuma outra associação significativa entre o perfil de hipermetilação dos demais genes avaliados e as características clínico-patológicas estudadas como sexo, sítio primário, tipo histológico, presença de metástase ao diagnóstico, grau de HUVOS e recidiva (Tabelas 6, 7, 8, 9, 10, 11,12).

Tabela 7 - Associação entre hipermetilação do gene *CDH1* e variáveis clínico-patológicas.

	<i>Características</i>	<i>Não Metilado</i>	<i>Metilado</i>	p*
idade	< 12 anos	12	2	0,03
	> 12 anos	9	11	
sexo	feminino	13	5	0,28
	masculino	8	8	
sítio	fêmur	13	5	0,29
	outros	5	8	
tipo histológico	osteoblastico	14	7	0,43
	outros	4	4	
metastase	não	17	7	0,13
	sim	4	6	
Huvos	I e II	12	8	***
	III e IV	9	5	
recidiva	não	10	6	***
	sim	11	7	

*log-rank

Tabela 8 - Associação entre hipermetilacao do gene *CALCA* e variaveis clinico-patologicas.

	<i>Caracteristicas</i>	<i>Não Metilado</i>	<i>Metilado</i>	p*
idade	< 12 anos	11	3	***
	> 12 anos	16	4	
sexo	feminino	11	5	0,2
	masculino	20	4	
sítio	fêmur	16	2	0,2
	outros	11	5	
tipo histológico	osteoblastico	17	4	***
	outros	7	1	
metastase	não	20	4	0,3
	sim	7	3	
Huvos	I e II	17	3	0,4
	III e IV	10	4	
recidiva	não	13	4	***
	sim	14	3	

*log-rank

Tabela 9 - Associação entre hipermetilacao do gene *SFRP1* e variaveis clinico-patologicas.

	<i>Caracteristicas</i>	<i>Não Metilado</i>	<i>Metilado</i>	p*
idade	< 12 anos	11	3	***
	> 12 anos	15	5	
sexo	feminino	12	6	0,2
	masculino	14	2	
sítio	fêmur	16	2	0,1
	outros	10	6	
tipo histológico	osteoblastico	17	4	***
	outros	6	2	
metastase	não	20	4	0,1
	sim	6	4	
Huvos	I e II	14	6	0,4
	III e IV	12	2	
recidiva	não	14	2	0,2
	sim	12	6	

*log-rank

Tabela 10 - Associação entre hipermetilacao do gene *HIC1* e variaveis clinico-patologicas.

	<i>Caracteristicas</i>	<i>Não Metilado</i>	<i>Metilado</i>	<i>p*</i>
idade	< 12 anos	12	2	0,42
	> 12 anos	14	6	
sexo	feminino	16	2	0,08
	masculino	10	6	
sitio	fêmur	15	3	0,27
	outros	11	5	
tipo histológico	osteoblastico	14	7	0,43
	outros	4	4	
metastase	não	20	4	0,19
	sim	6	4	
Huvos	I e II	16	4	0,42
	III e IV	10	4	
recidiva	não	13	3	0,69
	sim	13	5	

*log-rank

Tabela 11 - Associação entre hipermetilacao do gene *p14* e variaveis clinico-patologicas.

	<i>Caracteristicas</i>	<i>Não Metilado</i>	<i>Metilado</i>	<i>p*</i>
idade	< 12 anos	5	9	0,2
	> 12 anos	3	17	
sexo	feminino	4	14	***
	masculino	4	12	
sitio	fêmur	6	12	0,2
	outros	2	14	
tipo histológico	osteoblastico	6	15	0,6
	outros	1	7	
metastase	não	16	8	0,04
	sim	10	0	
Huvos	I e II	4	16	0,6
	III e IV	4	10	
recidiva	não	5	9	0,4
	sim	3	17	

*log-rank

Tabela 12 - Associação entre hipermetilacao do gene *AIM1* e variaveis clinico-patologicas.

	<i>Caracteristicas</i>	<i>Não Metilado</i>	<i>Metilado</i>	p*
idade	< 12 anos	7	7	0,2
	> 12 anos	6	14	
sexo	feminino	7	11	***
	masculino	6	10	
sitio	fêmur	8	10	0,4
	outros	5	11	
tipo histológico	osteoblastico	10	11	0,4
	outros	2	6	
metastase	não	10	14	0,7
	sim	3	7	
Huvos	I e II	7	13	0,7
	III e IV	6	8	
recidiva	não	7	9	0,7
	sim	6	12	

*log-rank

Tabela 13: Associação entre hipermetilacao do gene *ESR1* e variaveis clinico-patologicas.

	<i>Caracteristicas</i>	<i>Não Metilado</i>	<i>Metilado</i>	p*
idade	< 12 anos	3	11	0,6
	> 12 anos	2	18	
sexo	feminino	2	16	0,6
	masculino	3	13	
sitio	fêmur	1	17	0,1
	outros	4	12	
tipo histológico	osteoblastico	3	18	0,59
	outros	2	6	
metastase	não	4	20	***
	sim	1	1	
Huvos	I e II	4	16	0,37
	III e IV	1	13	
recidiva	não	2	14	***
	sim	3	15	

*log-rank

A análise das sobrevidas globais em 5 anos realizadas pelo método de *Kaplan-Meier* e comparadas pelo teste de *log-rank* não identificou nenhuma associação significativa com o perfil de hipermetilação dos 7 genes investigados (Figuras 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22). Entretanto, embora a diferença na sobrevida global entre os paciente com e sem hipermetilação do gene *ESR1* não seja significativa ($p=0,058$), os pacientes com *ESR1* metilado parecem ter um pior prognóstico quando comparados com os portadores de osteossarcoma com *ESR1* não-metilado (Figura 22)

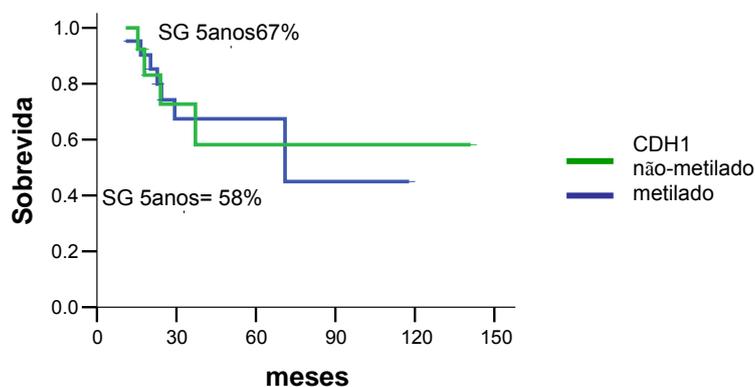


Figura 16 - Sobrevida global – Gene *CDH1*: metilado 67% x não-metilado 58% ($p=0,942$).

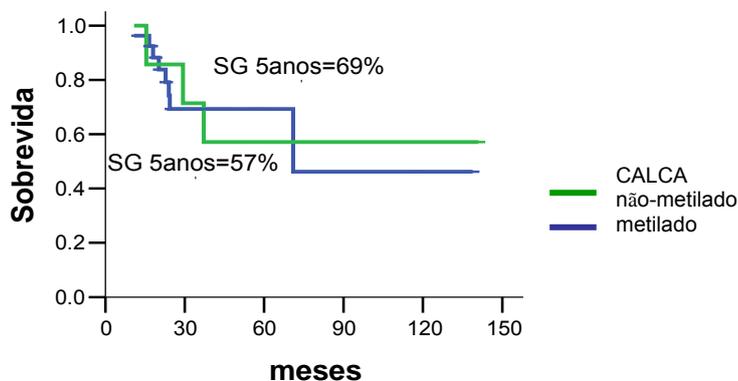


Figura 17 - Sobrevida global – Gene *CALCA*: metilado 69% x não-metilado 57% ($p=0,966$)

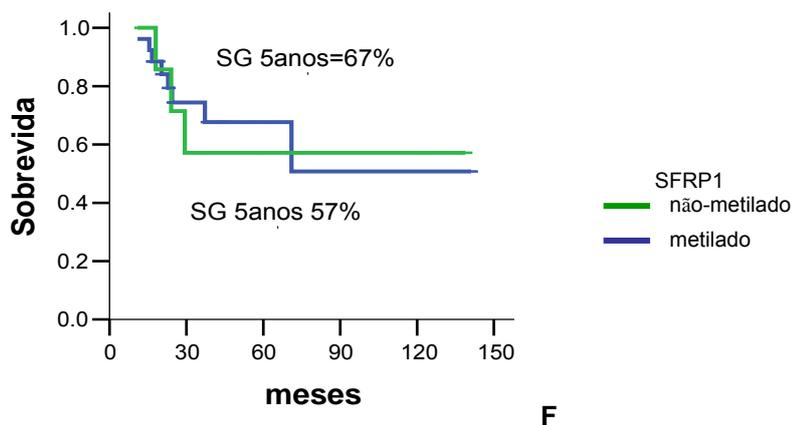


Figura 18 - Sobrevida global – Gene *SFRP1*: metilado 67% não-metilado 57% ($p=0,860$)

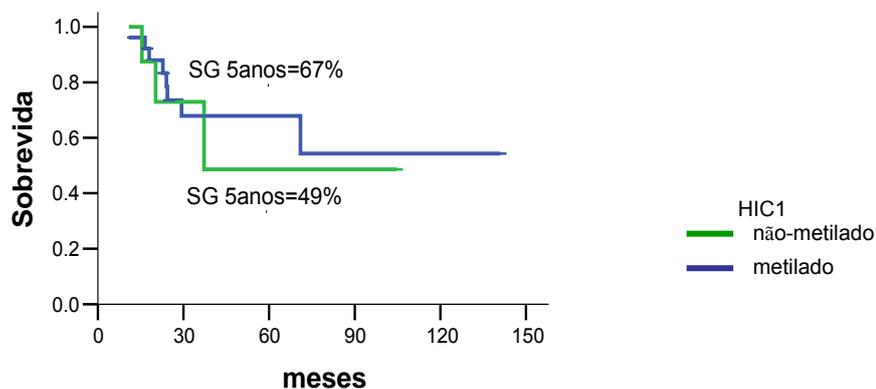


Figura 19 - Sobrevida global – Gene *HIC1*: metilado 67% x não-metilado 49% ($p=0,712$)

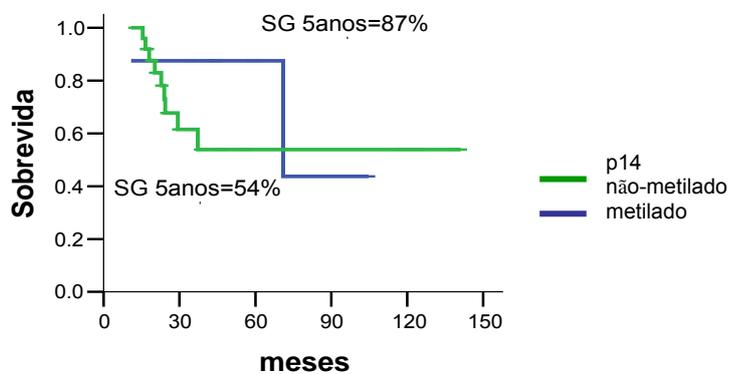


Figura 20 - Sobrevida global – Gene *p14*: metilado 87% x não-metilado 54% ($p=0,390$)

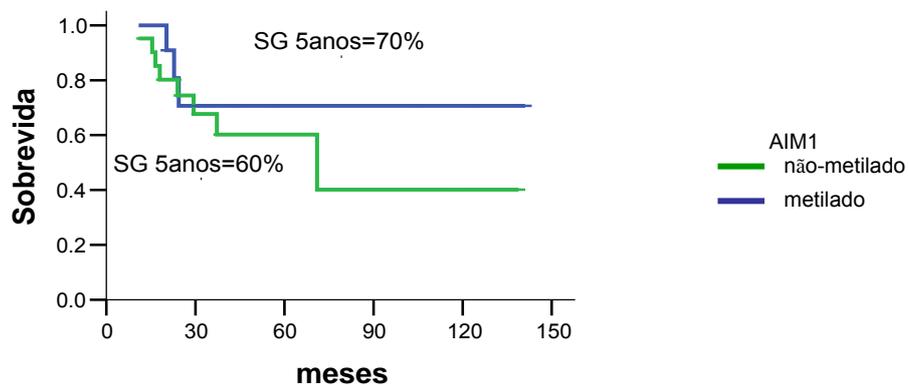


Figura 21 - Sobrevida global – Gene *AIM1*: metilado 70% x não-metilado 60% ($p=0,391$)

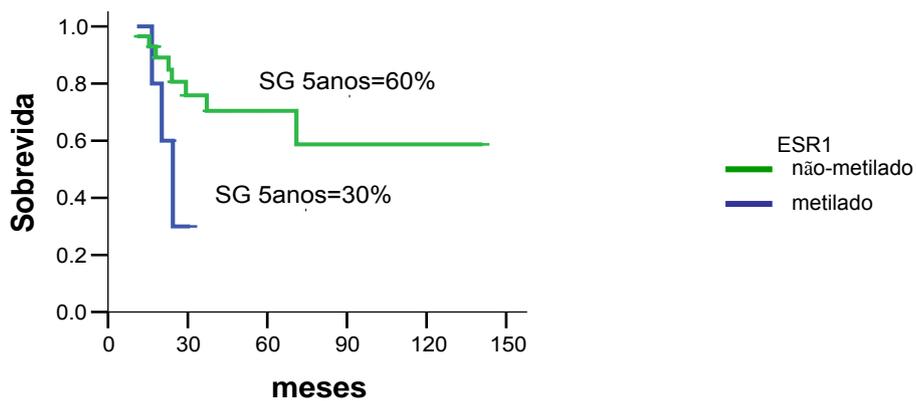


Figura 22 - Sobrevida global – Gene *ESR1*: metilado 60% x não-metilado 30% ($p=0,058$)

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisado o perfil de metilação de 18 genes em amostras de osteossarcoma sem tratamento quimioterápico prévio, sendo este o maior número de genes avaliados em osteossarcoma até o momento até o momento.

Apesar do osteossarcoma ser o mais freqüente tumor ósseo em crianças e adolescentes, os tumores ósseos são raros e correspondem a 0,2% de todos os cânceres o que dificulta a obtenção de amostras de tecido tumoral fresco e congelado pré-tratamento quimioterápico.

Mesmo com uma casuística de 34 pacientes, o perfil de pacientes descritos neste estudo não difere do observado em outros estudos publicados. Em nosso estudo a idade média dos pacientes foi de 13,5 anos o que coincide com o período de maior incidência deste tipo tumoral (2ª década de vida). Não houve diferença de acometimento entre os sexos. A grande maioria dos pacientes apresentava comprometimento de ossos longos, especialmente fêmur e tíbia. O tipo histológico mais freqüente foi o osteoblástico. Em nosso estudo 29,4% dos pacientes eram metastáticos ao diagnóstico e 52,9% dos paciente apresentaram recidiva da doença após tratamento quimioterápico de primeira linha. A sobrevida global em 5 anos para todo o grupo foi de 64%. Conforme esperado, as variáveis clinico-patológicas que apresentaram impacto estatisticamente significativos na sobrevida foram a presença de metátases, recidiva tumoral após tratamento

primário e grau de necrose. Idade, sexo, tipo histológico e sítio tumoral primário não apresentaram impacto na sobrevida.

Em um estudo realizado pelo grupo italiano, o qual reuniu 300 pacientes com diagnóstico de osteossarcoma de extremidades não metastático tratados no Instituto Rizzoli entre setembro de 1986 e dezembro de 1992, mostrou que 56% dos pacientes eram do sexo masculino e 44% do sexo feminino, a idade média foi de 15 anos (mediana de 15,9 anos), o sítio primário mais freqüentemente acometido foi fêmur (52%) seguido por tibia (30%), úmero (11%) e fíbula (5%) e o diagnóstico do subtipo osteoblástico foi feito em 65% dos pacientes. Em relação o grau de necrose (grau de HUVOS) 68% dos pacientes foram classificados como bons respondedores (HUVOS III e IV) enquanto 32% dos pacientes foram classificados como pobres respondedores (HUVOS I e II). As variáveis clínicas que influenciaram a sobrevida livre de eventos em 8 anos foram idade (< 12 anos 48% x 12 anos 63%, $p=0,04$), nível de DHL (alto = 51% x baixo ou normal = 63%, $p=0,04$), resposta histológica (HUVOS III e IV 63% x HUVOS I e II 52%, $p=0,01$) e tamanho tumoral (< 150mL 68% x > 150mL 53%, $p=0,002$) (FERRARI et al. 2001).

O grupo cooperativo europeu de estudos de tumores ósseos (COSS) analisou 1.702 pacientes entre 1980 e 1998. A idade média foi de 15 anos, 59% dos pacientes eram do sexo masculino e 41% do sexo feminino, o sítio primário mais freqüente foi fêmur (49,7%), seguido por tibia (26,4%) e úmero (10%) e o tipo histológico mais freqüente foi osteoblástico. Metástase foi encontrada em 12,4% dos pacientes e destes o pulmão foi o sítio metastático

mais freqüente (86%). Em relação o grau de necrose (grau de HUVOS), 55,6% dos pacientes apresentou boa resposta ao tratamento quimioterápico neoadjuvante. De todos os pacientes do estudo, 32% apresentaram recidiva local ou a distancia (BIELACK et al. 2002). A sobrevida global em 5 anos foi de 65% e os fatores que apresentaram impacto na sobrevida foram sítio primário em extremidades quando comparados com tumores localizados em esqueleto axial (54% x 19% $p=0,0001$), presença de metástases ao diagnóstico (15% x 58%, $p=<0,0001$) e resposta histológica ao tratamento quimioterápico neoadjuvante (38% x 67% , $p=0,0001$) (BIELACK et al. 2002).

O Grupo Brasileiro para Tratamento de Osteossarcoma (BOTG) avaliou 225 pacientes entre 1991 e 1999 (Estudo III -1991 a 1996 e Estudo IV-1996 a 1999). A média de idade dos pacientes foi de 14 anos e 56% eram do sexo masculino. Os sítios primários mais freqüentes foram fêmur (56%), tibia (29,8%), úmero (9,3%) e fíbula (2,7%). Aproximadamente 21% dos pacientes eram metastáticos ao diagnóstico e o pulmão foi o sítio mais freqüente de metástase (78%). De todo o grupo, 70,6% dos pacientes apresentou pobre resposta ao tratamento quimioterápico neoadjuvante e 44% dos pacientes apresentaram recidiva tumoral. A sobrevida global em 5 anos para todo o grupo foi de 50%. A variáveis clinicas que tiveram impacto significativo na sobrevida global em 5 anos foram presença de metástases ao diagnóstico (60% x 12%, $p=0,001$), grau de resposta histológica (I=44%, II=48%, III=77% e IV=68%, $p=0,005$). Outras variáveis que apresentaram impacto na sobrevida foram tipo de cirurgia realizada e tamanho tumoral

(PETRILLI et al. 2006), porém estas variáveis não foram avaliadas no presente estudo.

Deste modo, podemos inferir que a casuística analisada neste estudo apresenta características clínico-patológicas semelhantes aos de outros estudos publicados por importantes grupos envolvidos no tratamento de osteossarcoma na faixa etária pediátrica. Ou seja, apesar do pequeno tamanho da casuística analisada ($n = 34$), os achados deste estudo devem ser confiáveis, pois os casos incluídos neste estudo representam uma fiel amostragem dos portadores desta neoplasia.

Como já citado anteriormente, a raridade dos tumores ósseos dificulta a obtenção de amostras de tecido tumoral fresco e congelado pré-tratamento quimioterápico. Além desta dificuldade de obtenção de material, a extração de DNA a partir deste tipo de tecido também é um fator limitante neste tipo de estudo.

A casuística inicial deste estudo era de 60 amostras, um número expressivo, principalmente quando levamos em consideração os demais estudos encontrados na literatura referentes à análise de hipermetilação em osteossarcoma. Porém de apenas 56% das amostras (34 amostras) se conseguiu obter DNA de boa qualidade (quantificação adequado e amplificação do fragmento do gene *BRCA1* de 283pb) e foram estas as amostras analisadas no estudo. Com isso, a casuística analisada foi semelhante a de outros estudo de hipermetilação em osteossarcoma. Análises estatísticas mostraram não haver diferenças significantes entre a

casuística inicial (n = 60) e aquela efetivamente analisada (n = 34) no tocante à variáveis categóricas e não-categóricas.

Devido a escassez de material, optou-se por realizar inicialmente um estudo piloto onde se analisou o perfil de metilação dos 18 genes em um subgrupo de amostras (n = 13) das quais tinha-se obtido uma quantidade razoável de DNA (pelo menos 6µg). Uma análise comparativa demonstrou que as características clínico-patológicas deste subgrupo de pacientes(n=13) excluídos não deferiam do grupo total de amostras analisadas , portanto, nenhum viés foi introduzido por esta abordagem adotada. Através deste estudo foram selecionados os 7 genes mais frequentemente metilados para serem analisados no restante da casuística (n = 21).

A grande maioria dos estudos que tentam correlacionar o perfil de metilação em amostras de osteossarcoma com os aspectos clínicos da doença utilizaram a técnica de MSP-convencional. Esta é uma técnica que permite apenas a análise qualitativa do perfil de metilação e apresenta um certo grau de subjetividade na interpretação dos dados. Em nosso estudo utilizamos um método quantitativo (QMSP) na análise do perfil de metilação em osteossarcoma, que apresenta maior sensibilidade e acurácia para a análise do perfil de metilação, pois permite a detecção de um alelo metilado em meio a 10.000 alelos não metilados e também observamos uma redução da subjetividade na análise dos resultados, pois apenas as amostras que apresentarem uma curva de amplificação são consideradas positivas (EADS et al. 2000).

Este estudo avaliou o perfil de metilação de 18 genes em amostras de osteossarcoma e identificou os genes *CALCA*, *SFRP1*, *HIC1*, *CDH1*, *AIM1*, *p14^{ARF}*, *ESR1* como sendo os genes mais freqüentemente metilados (pelo menos 30%) nesta neoplasia. Dos 18 genes incluídos neste estudo, 12 jamais haviam sido avaliados em osteossarcoma (*AIM1*, *APC*, *CALCA*, *CCNA1*, *CDH1*, *ESR1*, *GSTP1*, *MLH1*, *THBS1*, *RAR β* , *SOCS1* e *SFRP1*). Por outro lado, existem relatos na literatura sobre o perfil de hipermetilação dos genes *CDKN2A*, *DAPK*, *HIC1*, *RASSF1A*, *p14^{ARF}* e *RB1*, em amostras de osteossarcoma.

O *CDKN2A*, localizado no locus 9p21, é um gene supressor de tumor que induz a parada do ciclo celular em G1 pela inibição da fosforilação da proteína *RB1* (BADAL et al. 2007). BENASSI et al. (2001) analisaram 21 amostras de osteossarcoma através de MSP convencional e encontraram metilação de *CDKN2A* em 57% das amostras. Por outro lado, HARADA et al. (2002), analisando 11 casos de osteossarcoma, encontraram o gene *CDKN2A* metilado em apenas 9% das amostras. Os nossos dados são concordantes com os de Harada e colaboradores, pois, em nenhuma das 34 amostras de osteossarcoma avaliadas, foi detectada a metilação deste gene.

OH et al. (2006) que, analisando o perfil de hipermetilação da região promotora do gene *p14^{ARF}* em 32 amostras de osteossarcoma através da técnica de MSP convencional, demonstraram que a metilação deste gene estava presente em 47% das amostras e este fato correlacionou-se com uma pior sobrevida dos pacientes (não metilado SG 79% x metilado SG 31%, $p=0,03$). Os resultados do nosso estudo diferem deste, pois o gene

p14^{ARF} se mostrou hipermetilado em 23,5% das amostras avaliadas e foi possível encontrar uma correlação estatisticamente significativa entre o nível de metilação deste gene e a ausência de metástases ao diagnóstico ($p=0,04$). Ou seja, a hipermetilação deste gene parece estar correlacionada com um melhor prognóstico para os pacientes de osteossarcoma. Existem relatos na literatura de estudos com outros tipos tumorais que também identificaram a hipermetilação de *p14^{ARF}* como fator de bom prognóstico. Por exemplo, SAILARSREE et al. (2008) analisaram 116 amostras de pacientes com carcinoma oral e concluíram que a metilação do gene *p14^{ARF}* relaciona-se com a baixa taxa de recorrência local e melhor prognóstico quando comparados com pacientes que não apresentavam hipermetilação deste gene.

Ao proteína codificada pelo gene *RASSF1A*, localizado no locus 3p21.3, induz a parada do ciclo celular através da interação com a proteína de reparo XPA e inibição do acúmulo de ciclina D1. LIM et al. (2003) analisaram 10 casos de osteossarcoma e encontraram metilação do gene *RASSF1A* em 80% das amostras, enquanto que, HOU et al. (2006), analisando 30 casos desta neoplasia óssea, detectaram metilação deste mesmo gene em apenas 14% das amostras. Os nossos dados são similares aos descritos por este segundo grupo, pois em nosso estudo piloto o gene *RASSF1A* apresentou-se metilado em 7% das amostras analisadas.

No estudo realizado por PATIÑO-GARCÍA et al. (2002) foram analisadas 27 amostras de osteossarcoma e o gene *RB1* mostrou-se metilado em 14% das amostras. GUERRERO et al. (2004) analisaram as alterações

moleculares encontradas em diversos genes implicados na gênese do osteossarcoma em 29 amostras de tecido tumoral ósseo, sendo que, em nenhuma das amostras o gene *RB1* apresentou-se metilado. Os nossos resultados demonstraram que o gene *RB1* também não estava metilado em nenhuma das amostras analisadas. Já é bem definido na literatura a importância do gene *RB1* na tumorigênese do osteossarcoma, porém os dados de hipermetilação sugerem que este não deva ser o mecanismo responsável pelo silenciamento deste gene nesta neoplasia.

O gene *HIC1* é um gene supressor de tumor e está localizado no locus 17p13.3. RATHI et al. (2004) analisaram o perfil de metilação deste gene *HIC1* em 157 casos de tumores pediátricos e encontraram hipermetilação em 17% dos casos de osteossarcoma avaliados (2 casos em 12 amostras). Em nosso estudo o gene *HIC1* foi encontrado metilado em 76,5% das amostras tumorais, possivelmente isto pode ser explicado pela maior sensibilidade da técnica utilizada em nosso estudo (QMSP) pois no estudo referido a técnica utilizada foi MSP convencional. Além disso, os autores não descrevem quais nucleotídeos CG foram analisados, por isso não se pode ter certeza que a mesma região foi analisada em ambos os estudos.

HOU et al. (2006) analisaram o perfil de metilação de 5 genes de 30 amostras de osteossarcoma e margens cirúrgicas através de QMSP. Os genes *RASSF1A*, *TIMP3*, *MGMT*, *DAPK* e *CDKN2A* foram encontrados diferencialmente metilados em tecidos tumorais quando comparados com tecidos normais (margens cirúrgicas). Estes autores não fizeram uma análise

individual da metilação de cada gene, mas agruparam as amostras em metiladas e não-metiladas. Desta forma conseguiram demonstrar uma diferença estatisticamente significativa entre a presença de DNA metilado e a presença de metastases ($p < 0,01$).

Dentre os genes que apresentaram uma porcentagem significativa de metilação nas amostras avaliadas no nosso estudo estão os genes *CALCA*, *SFRP1*, *CDH1* e o *AIM1*. Entretanto, não houve correlação significativa entre a hipermetilação destes genes e as variáveis clínico-patológicas analisadas.

O gene *CALCA* que codifica uma proteína chamada calcitonina, cuja função é a redução dos níveis séricos de cálcio, efeito oposto ao do hormônio da paratireóide. Este gene encontrou-se metilado em 79,4% das amostras, porém não houve nenhuma correlação significativa com as variáveis analisadas.

Outro gene com alta frequência de hipermetilação (76,5%) foi o *SFRP1*, que atua como antagonista da via Wnt (BHAT et al. 2007). Alguns estudos descrevem este gene como hipermetilado em câncer gástrico e intestinal (SUZUKI et al. 2000).

O gene *CDH1* codifica a proteína de adesão celular E-caderina. A redução da expressão deste gene está relacionada com a perda de adesão celular, com conseqüente invasão celular e metástases. Em nosso estudo este gene foi encontrado como hipermetilado em 61,8% das amostras.

O gene *AIM1* (hipermetilados em 38,2% das amostras avaliadas) apresenta função supressora de tumor e relaciona-se com o citoesqueleto celular.

O gene *ESR1*, localizado no locus 6q25. 1, codifica o receptor de estrógeno 1, uma proteína com seis domínios funcionais, com duas regiões com atividade transcripcional. Este receptor pode iniciar ou intensificar a transcrição de genes responsivos ao estímulo estrogênico.

O estrógeno tem papel multifuncional, influenciando o crescimento, diferenciação e função de diversos tecidos. No tecido ósseo, o estrógeno tem importante papel na regulação do crescimento ósseo durante a puberdade e remodelamento ósseo no indivíduo adulto (STOSSI et al. 2004). Alguns autores têm sugerido que o efeito estrogênico mediado pelo *ESR1* está envolvido com a mineralização óssea e a deleção homozigótica deste gene esta associada com severa osteoporose e aumento do *turn-over* ósseo (LIMA et al. 2004). Além disto, vários estudos tem demonstrado a presença destes receptores em osteoblastos e osteoclastos, porém com atividades distintas (BORD et al. 2001).

Um achado relevante em nosso estudo foi a associação do nível de metilação do gene receptor de estrógeno 1 (*ESR1*) com o prognóstico dos pacientes. Este gene encontrou-se metilado em 14,7% das amostras analisadas e podemos observar que quando *ESR1* encontrava-se metilado a sobrevida global em 5 anos é pior (não-metilado 60% x metilado 30%, $p=0,058$). Apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa, as curvas de sobrevida mostram uma clara tendência de separação dos dois grupos e, por isso acreditamos que a falta de significância se deva ao reduzido tamanho da casuística

CASAS-GANEM et al. (2005) analisaram 110 pacientes com diagnóstico de osteossarcoma e concluíram que aqueles que expressavam receptor de estrógeno 1 (*ESR1*) apresentavam doença localizada e melhor sobrevida. Em adição, concluíram neste estudo que altos níveis de *ESR1* inibiam proliferação celular.

Já foi demonstrado que a hipermetilacao deste gene pode ser um importante mecanismo de repressão transcricional e silenciamento gênico (Issa et al., 1994). Portanto, os nossos resultados concordam com os achados de Casas-Ganem e colaboradores, pois, os pacientes em que *ESR1* não esta metilado, devem expressar este receptor e, assim como reportado por aqueles autores, apresentam um melhor prognóstico.

Nossos dados sugerem que o receptor de estrógeno 1 (*ESR1*) pode ser utilizado como um marcador prognóstico para o osteossarcoma. Pode-se imaginar que testes pré-operatórios possam ser realizados e, quando este gene estiver hipermetilado, a terapêutica deverá ser intensificada para que sejam alcançadas maiores taxas de cura, com melhora da sobrevida. Entretanto, a avaliação de um número maior de casos é imprescindível para uma melhor elucidação e confirmação destes achados. Entretanto, a avaliação de um número maior de casos torna-se necessária para uma melhor elucidação e confirmação deste achado.

6 CONCLUSÕES

- 1 Os genes mais frequentemente metilados em osteossarcoma são *CALCA* (79%), *SFRP1* (76%), *HIC1* (76%), *CDH1* (61%), *AIM1* (38%), *MLH1* (26%), *p14^{ARF}* (23%) *THBS1* (14%) e *ESR1* (14%).
- 2 A hipermetilação do gene *CDH1* apresentou uma associação significativa com a idade ao diagnóstico maior que 12 anos ($p= 0,03$)
- 3 A hipermetilação da região promotora do gene *p14^{ARF}* apresentou associação estatisticamente significativa com ausência de metástases ao diagnóstico ($p=0,04$).
- 4 A hipermetilação do gene *ESR1* realcionou-se com uma pior sobrevida global dos pacientes analisados ($p=0,058$).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bacci G, Longhi A, Versari M, Mercuri M, Briccoli A, Picci P. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at the single institution. **Cancer** 2006; 106:1154-61.

Badal V, Menendez S, Coober D, Lane DP. Regulation of the p14 ARF promoter by DNA methylation. **Cell Cycle** 2007; 7:112-9.

Batanian JR, Cavalli LR, Aldosari NM, et al. Evaluation of paediatric osteosarcomas by classic cytogenetic and CGH analyses. **Mol Pathol** 2002; 55:389-93.

Bhat RA, Stauffer B, Komm BS, Bodine PV. Structure-function analysis of secreted frizzled-related protein-1 for its Wnt antagonist function. **J Cell Biochem** 2007; 102:1519-28.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, et al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Human Mol Genet** 2001; 10:687-92.

Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol** 2005; 2:S4-S11.

Benassi M, Molendini L, Gamberi G, et al. Involvement of INK4A gene products in the pathogenesis and development of human osteosarcoma. **Cancer** 2001; 92:3062-7.

Bielack SS, Bielack-Kempf B, Delling G, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1072 patients treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. **J Clin Oncol** 2002; 20:776-90.

Bielack SS, Carrle D, Harges J, Schuck A, Paulussen M. Bone Tumors in Adolescents and Young Adults. **Curr Treat Options Oncol** 2008; 9:67-80.

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

Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:2309-14.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol** 2000; 25:169-93.

Casas-Ganem J. Skeletal complications of malignancy symposium. **Oncol Times** 2005; 27:37-8.

Clark JCM, Dass CR, Choong PFM. A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2007; 134:281-97.

Dalla-Torre CA, Yoshimoto M, Lee CH, et al. Effects of THBS3, SPARC and SPP1 expression on biological behavior and survival in patients with osteosarcoma. **BMC Cancer** 2006; 5:6-237.

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

dos Santos Aguiar S, de Jesus Giroto Zambaldi L, dos Santos AM, Pinto W Jr, Brandalise SR. Comparative genomic hybridization analysis of abnormalities in chromosome 21 in childhood osteosarcoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2007; 175:35-40.

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. **Nucleic Acids Res** 2000; 28:E32.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. **Cancer Res** 1999; 59: 67-70.

Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **Eur J Cancer** 2000; 36:2294-300.

Esteller M, Tortola S, Toyota M, et al. Hypermethylation-associated inactivation of p14^{ARF} is independent of p16^{INK4a} methylation and p53 mutational status. **Cancer Res** 2000; 60:129-33.

Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Lancet Oncol** 2003; 4:351-8.

Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. **Human Mol Genet** 2007; 16:50-9.

Esteller M. Epigenetics in cancer. **N Engl J Med** 2008; 358:1148-59.

Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Picci P, Giacomini S, Longhi A, Bacci G. Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: an analysis of 300 patients treated at Rizzoli Institute. **Ann Oncol** 2001; 12:1145-50.

Ferris J, Tornero OB, Garcia JAO, et al. Factores de riesgo para los tumores oseos malignos pediátricos. **An Pediatría (Barcelona)** 2005; 63:537-47.

Ford S, Saithna A, Grimer RJ, Picci P. Comparison of the outcome of conventional osteosarcoma at two specialist international orthopaedic oncology centres. **Sarcoma** 2004; 8:13-8.

Friend SH, Horowitz JM, Gerber MR, et al. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 1987; 84:9059-63.

Fuchs B, Zhang K, Schabel A, Bolander ME, Sarkar G. Identification of twenty-two candidate markers for human osteogenic sarcoma. **Gene** 2001; 278:245-52.

Gelberg KH, Fitzgerald EF, Hwang S, Dubrow R. Growth and development and other risk factors for osteosarcoma in children and young adults. **Int J Epidemiol** 1997; 26:272-8.

Gorlick R, Anderson P, Andrulis I, et al. Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development: meeting summary. **Clin Cancer Res** 2003; 9:5442-53.

Gronbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. **APMIS** 2007; 115:1039-59.

Guerrero JAL, Gines CL, Pellin A, Carda C, Bosch AL. Deregulation of the G1 to S-phase cell cycle checkpoint is involved in pathogenesis of human osteosarcoma. **Diag Mol Pathol** 2004; 13:81-91.

Gurney J, Swensen AR, Bulterys M: **Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995.**

Bethesda: National Cancer Institute; 1999. (SEER Program. NIH Pub No 99-4649).

Ham SJ, Koops S, van der Graaf WTA, von Horn JR, Postma L, Hoekstra HJ. Historical, current and future aspects of osteosarcoma treatment. **Eur J Surg Oncol** 1998; 24:584-600.

Harden SV, Tokumaru Y, Westra WH, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients. **Clin Cancer Res** 2003; 9:1370-5.

Harada K, Toyooka S, Maitra A, et al. Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumor and cell lines. **Oncogene** 2002; 21:4345-9.

Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med** 2003; 349:2042-54.

Hoagland MB, Grier RS, Hood MB. Beryllium-induced osteogenic sarcomata. **Cancer Res** 1950; 10:629-35.

Hou P, Ji M, Yang B, et al. Quantitative analysis of promoter hypermethylation in multiple genes in osteosarcoma. **Cancer** 2006; 106:1602-10.

Issa JPJ, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, Baylin S. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. **Nat Genet** 1994; 7:536-40.

Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J Nat Cancer Insist** 2001; 93:1747-52.

Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2004a; 10:8472-8.

Jeronimo C, Henrique R, Oliveira J, et al. Aberrant cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) gene expression and promoter methylation in prostate cancer. **J Clin Pathol** 2004b; 57:872-6.

Laird PW. The power and promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:253-66.

Lim S, Yang MH, Park JH, Nojima T, Hashimoto H, Unni KK, Park YK. Inactivation of the RASSF1A in osteosarcoma. **Oncol Rep** 2003; 10:897-901.

Lima F, Vico L, Lafage-Proust MH, van der Saag P, Alexandre C, Thomas T. Interactions between estrogen and mechanical strain effects on U2OS human osteosarcoma cells are not influenced by estrogen receptor type. **Bone** 2004; 35:1127-35.

Link MP, Gebhardt MC, Meyers PA. Osteosarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. **Principles of practice of pediatric oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2006. p.1074-115.

Marina N, Gerhardt M, Teot L, et al. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. **Oncologist** 2004; 9:422-41.

McIntyre JF, Smith-Sorensen B, Friend SH, et al. Germiline mutations of the p53 tumor supressor gene in children with osteosarcoma. **J Clin Oncol** 1994; 12:925-30.

Meyers PA, Gorlick R. Osteosarcoma. **Pediatr Clin North Am** 1997; 44:973-89.

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

Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, et al. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:1254-9.

Oh JH, Kim HSK, Kim HHK, Kim WH, Lee SH. Aberrant methylation of p14 gene correlates with poor survival in osteosarcoma. **Clin Orthop Relat Res** 2006; 442:216-22.

Patiño-García A, Piñeiro ES, Díez MZ, Iturriagoitia LG, Klüssmann FA, Ariznabarreta LS. Genetic and epigenetic alterations of the cell cycle regulators and tumor suppressor genes in pediatric osteosarcomas. **J Ped Hematol Oncol** 2003; 25:362-7.

Petrilli S, Penna V, Lopes Ademar, Figueiredo MTA, Gentil F. IIB Osteosarcoma. Current Management, Local Control, and Survival Statistics – São Paulo, Brazil. **Clin Orthop Relat Res** 1991; 270:60-6.

Petrilli AS, de Camargo B, Filho VO, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III e IV: prognostic factors and impact on survival. **J Clin Oncol** 2006; 24:1161-7.

Rathi A, Virmani AK, Harada K, et al. Aberrant methylation of the HIC1 promoter is a frequent event in specific pediatric neoplasms. **Clin Cancer Res** 2003; 9:3674-8.

Raymond AK, Ayala AG, Knuutila S. Conventional osteosarcoma. In: Kleihues P, Sobin L, Fletcher C, et al. editors. **Pathology and genetics of**

tumours of soft tissue and bone. Lyon: IARC Press; 2002. p.264-70.
(WHO Classification of Tumours)

Robertson KD. DNA methylation and human disease. **Nature** 2005; 6:597-610.

Rosen G, Murphy ML, Huvus AG, et al. Chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. **Cancer** 1976; 37:1-11.

Sailarsree R, Abhilash A, Sathyan KM, Nalinakumari KR, Thomas S, Kannan S. Differential roles of p16INK4A and p14ARF genes in prognosis of oral carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:414-20.

Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. **Cancer Genet Cytogenet** 2003; 145:1-30.

Singal R, Ginder GD. DNA Methylation. **Blood** 1999; 93:4059-70.

Stirzaker C, Song JZ, Davidson B, Clark SJ. Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells. **Cancer Res** 2004; 64: 3871-7.

Stossi F, Barnett SH, Frasor J, Komm B, Lyttle R, Katzenellenbogen BS. Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor α or ER β in human osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors. **Endocrinology** 2004; 145:3473-86.

Sulewska A, Niklińska W, Kozowski M, et al. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. **Folia Histochem Cytobiol** 2007; 45:149-58.

Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. **Nat Genet** 2004; 36:417-22.

Tan JZY, Schlicht SM, Powell G, et al. Multidisciplinary approach to diagnosis and management of osteosarcoma – a review of the St Vincent's Hospital experience. **Int Semin Surg Oncol** 2006; 3:1-8.

Togushida J, Yamagushi T, Dayton SH, et al. Prevalence and spectrum of germline mutations of p53 gene among patients with sarcoma. **N Engl J Med** 1992; 326:1301-8.

Tsuchiya T, Sekine K, Hinohara S, Namiki T, Nobori T, Kaneko Y. Analysis of the p16INK4, p14ARF, p15, TP53, and MDM2 genes and their prognostic implications in osteosarcoma and Ewing Sarcoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 120:91-8.

van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, et al. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. **Gut** 2002; 51:797-802.

Wolf M, El-Rifai W, Tarkkanen M, et al. Novel findings in gene expression detected in human osteosarcoma by cDNA microarray. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 123:128-32.

Wong IH, Chan J, Wong J, Tam PK. Ubiquitous aberrant RASSF1A promoter methylation in childhood neoplasia. **Clin Cancer Res** 2004; 10:994-1002.

Zielenska M, Bayani J, Pandita A, et al. Comparative genomic hybridization analysis identifies gains of 1p35 approximately p36 and chromosome 19 in osteosarcoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2001; 130:14-21.

ANEXO

Anexo 1 - Quadro de nível de metilação das 34 amostras.

	cdh1	thbs1	calca	mlh1	sfrp1	hic1	p14	Aim	esr1
1	0,000	0,000	5,726	2,809	0,000	24,398	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	44,441	0,000	6,267	0,000
3	4,776	0,000	4,417	0,174	2,396	100,000	0,000	0,000	0,000
4	0,050	0,000	2,426	0,048	0,000	100,000	0,000	0,000	0,000
5	0,103	0,000	0,000	0,000	1,564	53,471	0,477	7,487	0,047
6	1,003	0,001	100,000	0,000	3,792	100,000	1,739	0,000	0,000
7	0,000	0,000	0,813	0,000	2,279	0,000	0,000	0,000	0,000
8	1,049	0,029	15,209	0,000	1,860	31,460	7,893	0,081	0,000
9	0,000	0,000	0,000	0,000	16,318	1,945	0,000	5,296	0,000
10	0,642	0,024	0,000	0,000	4,703	0,000	1,107	6,695	0,010
11	0,000	0,000	100,000	0,000	58,287	0,000	0,000	30,340	0,000
12	0,401	0,000	63,761	3,379	2,164	11,358	0,000	28,458	0,000
13	0,000	0,000	38,468	5,908	100,000	0,000	0,000	0,000	100,000
14	0,000	0,000	3,910	0,000	1,978	0,000	0,000	12,518	0,000
15	0,780	1,596	13,946	0,000	1,226	0,810	0,054	0,284	0,000
16	35,165	0,142	8,022	0,000	19,503	59,004	0,000	26,164	0,000
17	0,228	0,112	20,932	0,000	0,513	63,104	0,054	0,068	0,000
18	3,867	0,001	30,905	0,000	0,000	100,000	0,280	12,27	0,000
19	0,000	0,000	52,368	0,000	100,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20	0,000	0,000	2,161	0,000	0,012	1,269	0,000	0,000	0,000
21	0,000	0,000	29,724	0,000	5,165	18,795	0,000	0,231	0,000
22	33,533	0,000	14,332	0,646	1,838	64,504	0,000	0,000	0,000
23	3,019	0,897	11,686	0,001	3,921	44,791	0,055	0,000	0,686
24	1,048	0,000	0,580	0,000	0,000	42,254	0,138	0,000	0,000
25	0,000	0,023	4,182	0,000	0,676	83,710	0,000	0,003	43,12
26	0,375	0,000	0,490	0,000	10,661	0,000	0,000	41,44	0,000
27	1,687	0,094	4,049	0,000	0,048	49,811	0,000	0,000	0,000
28	2,458	0,040	0,774	0,000	0,466	1,350	0,000	0,012	0,000
29	0,232	0,007	2,877	0,000	5,670	26,340	0,393	0,000	0,039
30	0,865	0,002	0,757	34,735	0,763	85,527	0,584	0,000	100,0
31	1,377	0,000	100,000	0,119	4,421	100,000	0,000	100,0	0,058
32	0,000	0,000	83,053	16,179	100,000	0,000	0,000	0,000	0,000
33	0,616	0,000	26,329	0,140	20,752	100,000	0,000	0,000	100,0
34	0,231	0,519	2,901	0,000	0,060	84,211	0,003	0,000	0,003