



Emilio Carlos Curcelli

PROGNÓSTICO EM OSTEOSSARCOMA:

*análise clínica, epidemiológica, histopatológica e imuno-histoquímica*

*Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de Botucatu - Unesp para  
obtenção do título de doutor em  
Bases Gerais da Cirurgia*

Botucatu  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Emilio Carlos Curcelli

# PROGNÓSTICO EM OSTEOSSARCOMA:

análise clínica, epidemiológica, histopatológica e imuno-histoquímica

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de Botucatu - Unesp para  
obtenção do título de doutor em Bases  
Gerais da Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Swain Müller  
Co-orientadora: Profa. Dra Anete Kinumi Ueda

Botucatu  
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
*Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus*

Curcelli, Emilio Carlos.

Prognóstico em osteossarcoma: análise clínica, epidemiológica, histopatológica e imuno-histoquímica / Emilio Carlos Curcelli. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Sérgio Swain Müller

Co-orientadora: Anete Kinumi Ueda

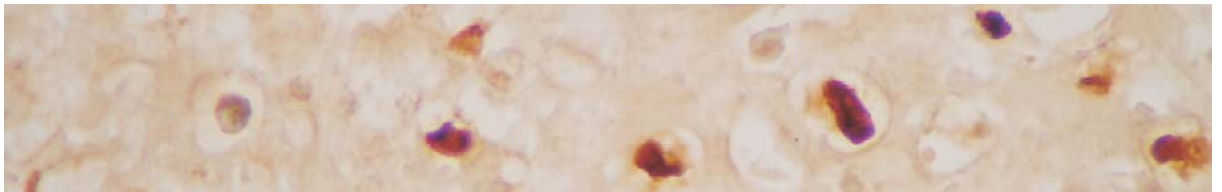
Assunto CAPES: 40101186

1. Osteossarcoma – Prognóstico 2. Ortopedia – Cirurgia

CDD 617.3

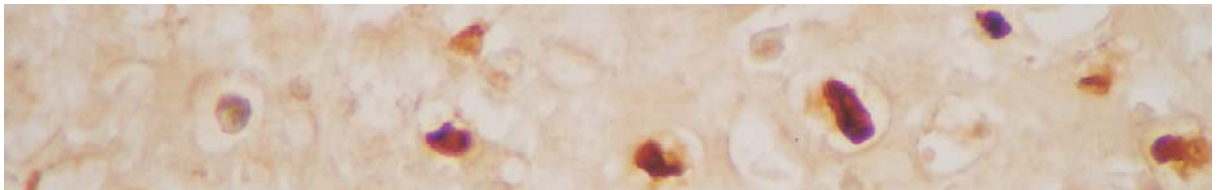
Palavras chave: Epidemiologia; Evolução clínica; Imunoistoquímica; Osteossarcoma; Patologia; Prognóstico

# Dedicatória



Aos meus pacientes

Agradecimento



## **AGRADECIMENTO**

Pelos caminhos que percorri sempre encontrei pessoas dispostas a me ajudar, entusiástica e despretenciosamente. Meus sinceros agradecimentos aos que contribuíram para minha formação e para a elaboração deste trabalho.

À minha mãe Maria Aparecida, guerreira, ao meu pai Emilio que se foi cedo e aos meus irmãos solidários Luzia, Paulo e Agnaldo.

À minha esposa Lara e aos meus quatro filhos Emilio, Júlia, Vitor e André, minha motivação.

Aos amigos da Disciplina de Ortopedia, Hamilton da Rosa Pereira, Alfredo Alcântara Barreto, Gilberto José Cação Pereira, Paulo Roberto de Almeida Silveiras, Reinaldo dos Santos Volpi, Trajano Sardenberg, Mauro dos Santos Volpi, Amauri Pinnafi, Ricardo Violante Pereira, Daniel Innocenti Dinhane, Denis Varanda, David Nicoletti Gumieiro, Rodrigo Vannini, Fábio Fernando Eloy Pinto e Maurício Aguiar Foloni pela ajuda e suporte. Em especial, ao José Luiz Villas Boas Novelli, de aluno exemplar a profissional excepcional, torna imperceptíveis minhas ausências.

Aos doutores Ademar Lopes, Benedito Mauro Rossi, Marco Túlio de Assis Figueiredo, Salim Zequi Garcia e Valter Pena, do Hospital A.C. Camargo, onde, orgulho-me, comecei na oncologia.

Aos meus inestimáveis companheiros de jornada do Hospital Estadual Bauru, sem os quais nossas conquistas não seriam possíveis, em especial, ao doutor Carlos Alberto Macharelli.



À professora doutora Marilza Vieira Cunha Rudge, pelas sugestões e incentivo.

Aos ortopedistas do Hospital Amaral Carvalho, doutores Pedro Luiz Budin e Gustavo Garcia de Arruda Falcão, eficientes companheiros de cirurgias e procedimentos oncológicos.

Aos doutores Vírgilio Antonio Rensi Colturato, Marcus Augusto Mauad, Cláudia Teresa de Oliveira e à funcionária Márcia Morelli Pavanelli, do Departamento de Hematologia e Oncologia Clínica do Hospital Amaral Carvalho.

Ao patologista doutor Francisco Carlos Quevedo, do Hospital Amaral Carvalho.

Aos patologistas doutores Aduino José Ferreira Nunes e Ulisses Frederique Junior do Serviço de Patologia do Hospital Estadual Bauru pelas sugestões, correções e leitura das lâminas.

A Maria Celina Camargo Ramos e aos professores doutores Antero Frederico Macedo de Miranda, Domingos Alves Meira e Pasqual Barretti, pelas sugestões e correções.

Aos professores doutores Carlos Roberto Padovani e Sérgio Alberto Rupp de Paiva pelas pacientes orientações e meticulosas análises estatísticas.

A assistente social Elaine Cristina Marchis, pela pesquisa e complementação de informações, resgate dos blocos de anatomia patológica e elaboração de tabelas.

A Enilze de Souza Nogueira Volpato, Marluci Betini, Diva Aparecida L. G. Rodrigues, Luciana Pizzani e Selma Maria de Jesus, da Biblioteca do Campus de Botucatu, um exemplo dignificante de competência, comprometimento e idealismo.

Aos funcionários da Seção Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, Janete Aparecida Herculano Nunes Silva, Lilian Cristina Nadal Bianchi, Nathanael Pinheiro Salles, Andréa Paula Longo Devidé, em especial, à Regina Célia Spadin, pelo apoio, segurança e serenidade.

A Celene Maria Carvalho Gandin e ao Marcos Roberto Franchi, funcionários do Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Ao Carlos Luiz Miguel, técnico de informática, do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela ajuda na digitação e impressão deste trabalho.

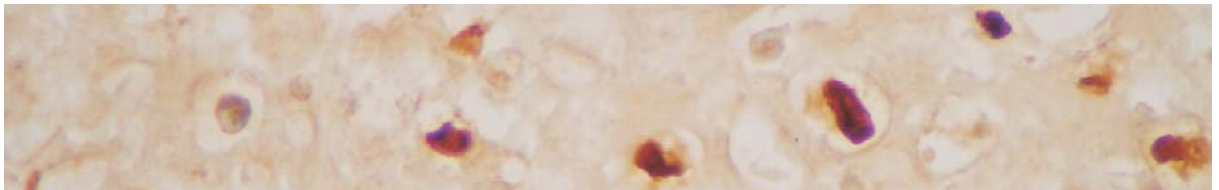
## AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao professor doutor Sérgio Swain Müller, mais que orientador, amigo desde os primeiros tempos da faculdade que, com muita competência, perseverança e paciência, conseguiu extrair de mim esta tese.

À professora doutora Anete Kinumi Ueda, brilhante e meticulosa patologista, co-orientadora deste trabalho.

Ao professor doutor Odair Carlito Michelin, que há muito tempo orienta e executa a maioria dos tratamentos quimioterápicos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, sempre de maneira disposta, eficiente e cuidadosa.

# Επίγραφε

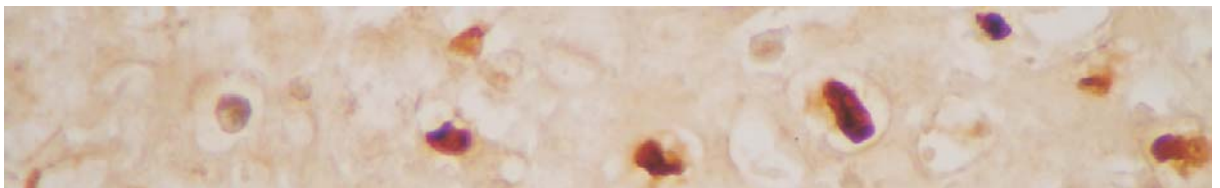


*Há um tempo em que é preciso  
abandonar as roupas usadas,  
que já têm a forma do nosso corpo,  
e esquecer os nossos caminhos,  
que nos levam sempre aos mesmos lugares.*

*É o tempo da travessia:  
e, se não ousarmos fazê-la,  
teremos ficado, para sempre,  
à margem de nós mesmos.*

*Fernando Pessoa*

# Resumo



## RESUMO

Curcelli EC. Prognóstico em osteossarcoma: análise clínica, epidemiológica, histopatológica e imuno-histoquímica [Thesis – Doutorado]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2008.

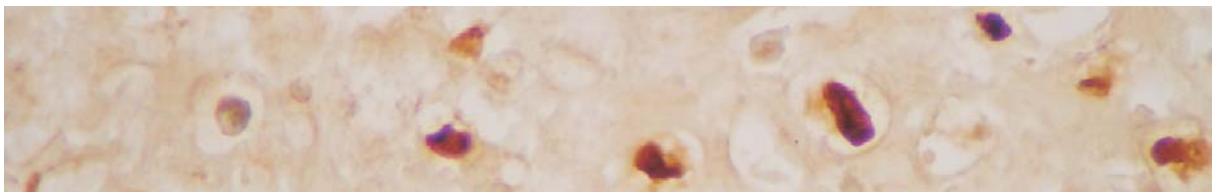
Em 69 pacientes com diagnóstico de osteossarcoma ósseo, primário e secundário, submetidos a tratamento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp (Botucatu – SP) e no Hospital Amaral Carvalho (Jaú – SP), no período de 1990 a 2004, foi verificada a possível associação entre prognóstico e fatores clínicos, epidemiológicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos. Os pacientes foram submetidos a diferentes protocolos de tratamento e, na maioria das peças de ressecção tumoral, procedeu-se à quantificação do efeito quimioterápico neo-adjuvante de acordo com os critérios preconizados por Huvos (1991). Os dados foram coletados dos prontuários hospitalares e nas amostras da biópsia óssea, realizada pré-tratamento, foi verificada a ocorrência de apoptose e da expressão da proteína p53, pelo método imuno-histoquímico (Tunel e ABC). Os resultados foram submetidos à análise univariada de sobrevida com construção de curvas de Kaplan-Meier. As associações entre procedimento cirúrgico e grau de necrose e, entre recidiva e grau de necrose, foram analisadas pelo Teste de Goodman (Goodman, 1964,1965). Foi constatado que as variáveis, idade, sexo, classificação histológica e localização do tumor, não apresentaram associação com prognóstico; pacientes com tumores estágio III apresentam pior prognóstico. Abandono de tratamento está associado a pior prognóstico e relacionado à evolução clínica insatisfatória; cirurgia de amputação foi indicador indireto de mau prognóstico, pois foi realizada em pacientes com tumores avançados ou que não responderam ao tratamento quimioterápico neo-adjuvante; complicações, sobretudo recidiva local, estão relacionadas a mau prognóstico e necrose pós-quimioterapia apresentou associação

significativa com sobrevida. Houve ocorrência de apoptose e expressão da proteína p53 mutante nas fases iniciais do osteossarcoma, porém sem associação com prognóstico.

Palavras-chave: osteossarcoma; prognóstico; evolução clínica; epidemiologia; patologia; imunohistoquímica.



# Abstract



**ABSTRACT**

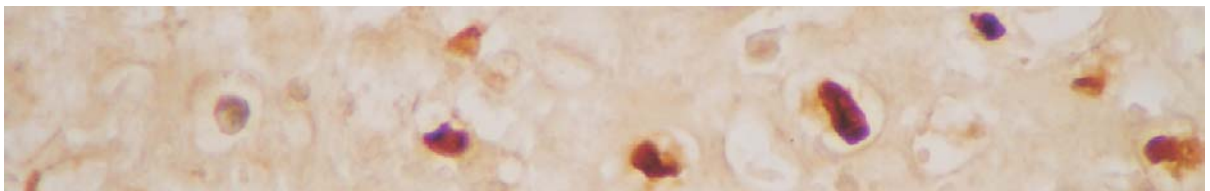
Curcelli EC. Prognóstico em osteossarcoma: análise clínica, epidemiológica, histopatológica e imuno-histoquímica [Thesis – Doutorado]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2008.

A possible association between prognosis and clinical, epidemiological, histopathological, and immunohistochemical factors was evaluated in 69 patients with confirmed diagnosis of primary and secondary bone osteosarcoma treated in the University Hospital of Botucatu Medical School, School of Medicine University Hospital, Unesp (Botucatu, SP, Brazil) and in Amaral Carvalho Hospital (Jaú, SP, Brazil), from 1990 to 2004. Patients were treated by different treatment protocols and in the majority of resected tumour samples the effects of neoadjuvant chemotherapy were analyzed using Huvos criteria (1991). Data were collected from medical records and in pre-treatment bone biopsies, apoptosis and p53 protein expression were evaluated by immunohistochemistry (Tunel and ABC). The results were submitted to univariate analysis and global survival analyzed by Kaplan-Meier survival curves. Association between surgical procedure and necrosis level or relapse was tested using Goodman test for differences between and in multinomial populations (Goodman, 1964, 1965). No association was found between prognosis and age, gender, tissue predominance and tumour location; patients with stage III tumours presented worse prognosis. Treatment withdrawal implied in worse prognosis, as a consequence of unsatisfactory clinical

evolution; amputation was an indirect factor of bad prognosis as a possible consequence of its indication for patients with advanced tumours or for those without response to neoadjuvant chemotherapy. Complications, especially local relapse, were related to bad prognosis; while post chemotherapy necrosis had a statistically significant association with survival. There was apoptosis and mutant protein p53 expression that initial phases of osteosarcoma, but without any association with prognosis.

**Keywords:** osteosarcoma; prognosis; clinical evolution; epidemiology; pathology; immunohistochemistry.

# Sumário



## SUMÁRIO

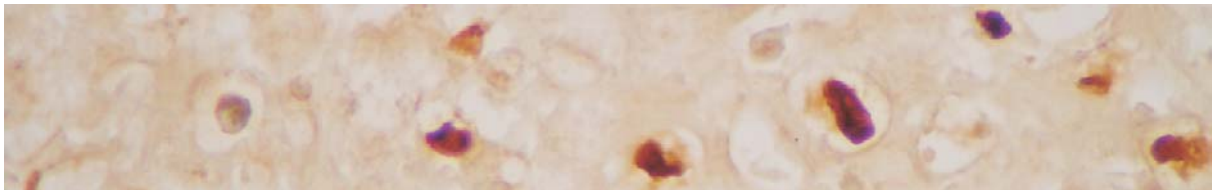
Resumo	
Abstract	
1 Introdução.....	21
2 Revisão da literatura.....	25
2.1 Idade.....	27
2.2 Sexo .....	28
2.3 Localização do tumor .....	29
2.4 Dimensão .....	30
2.5 Classificação .....	31
2.6 Estadiamento .....	35
2.7 Tratamento .....	37
2.7.1 Quimioterapia .....	37
2.7.2 Cirurgia do tumor primário .....	38
2.8 Resposta histológica à quimioterapia pré-operatória .....	39
2.9 Outros fatores .....	41
2.10 O gene <i>TP53</i> e a proteína p53.....	43
2.10.1 Gene <i>TP53</i> , proteína p53 e osteossarcoma .....	47
2.11 O processo apoptótico .....	54
2.11.1 Apoptose e neoplasias .....	57
3 Objetivo .....	63
4 Casuística e método .....	65
4.1 Padronização .....	68
4.2 Estudo imuno-histoquímico .....	71
4.2.1 Procedimentos gerais .....	72
4.2.2 Reação imuno-histoquímica para p53 .....	73
4.2.3 Determinação da apoptose em biópsia óssea pelo método de Tunel ...	74
4.2.4 Cálculo do índice de apoptose .....	75
4.3 Análise estatística .....	76

---

5 Resultado .....	78
5.1 Tempo de seguimento .....	79
5.2 Idade .....	79
5.3 Sexo .....	80
5.4 Localização do tumor .....	81
5.5 Classificação .....	82
5.6 Estadiamento .....	83
5.7 Adesão ao tratamento .....	83
5.8 Protocolo de tratamento quimioterápico .....	84
5.9 Cirurgia do tumor primário .....	85
5.10 Complicações do tratamento .....	87
5.11 Resposta histológica à quimioterapia pré-operatória .....	89
5.12 Evolução clínica .....	90
5.13 Expressão da proteína p53 .....	90
5.14 Índice de apoptose .....	91
5.15 Análise da sobrevida .....	91
5.16 Curvas de sobrevivência de acordo com método de Kaplan-Meier .....	95
6 Discussão .....	102
6.1 Casuística .....	103
6.2 Estadiamento .....	103
6.3 Tratamento .....	105
6.3.1 Tratamento quimioterápico .....	105
6.3.2 Tratamento cirúrgico .....	106
6.3.3 Complicações do tratamento .....	107
6.4 Resposta histológica à quimioterapia pré-operatória .....	110
6.5 Sobrevida .....	111
6.6 Expressão da proteína p53 .....	112
6.6.1 Metodologia .....	112
6.6.2 Resultados .....	114

6.7 Índice de apoptose .....	117
6.7.1 Metodologia .....	117
6.7.2 Resultados .....	119
7 Considerações finais .....	122
8 Conclusão .....	125
Referências .....	127
Apêndice .....	162

# Introdução





## 1 INTRODUÇÃO\*

Pode-se considerar que existe consenso acerca dos avanços obtidos no tratamento dos pacientes portadores de osteossarcoma.

As novas propostas terapêuticas e técnicas diagnósticas aliadas à abordagem multidisciplinar contribuíram para elevar a sobrevida da maioria dos pacientes com osteossarcoma. A associação entre quimioterapia adjuvante e cirurgia tornou possível o controle sistêmico da doença e a excisão completa do tumor primário, muitas vezes sem necessidade de amputação.

Contudo, um terço dos pacientes portadores de osteossarcoma não usufruirão desses benefícios. Em geral, são pacientes que, no decorrer do tratamento, apresentarão baixo índice de necrose tumoral em decorrência do tratamento quimioterápico, alto risco de recaída da doença e, inevitavelmente, curta sobrevida. Da mesma forma, os pacientes que apresentam metástases ao diagnóstico, permanecem com perspectiva clínica adversa (Ferguson & Goorin, 2001; Wang, 2005).

Em 1992, Meyers et al. alertavam para a necessidade de se aumentar o número de pacientes com resposta favorável, identificando os que poderiam ter resposta desfavorável e, para esses, buscar novas estratégias de tratamento.

Ham et al. (1998) reconheceram que o progresso inicial do tratamento do osteossarcoma baseado na atuação multiprofissional aumentava a possibilidade de sobrevida e a taxa de cirurgia conservadora. No entanto,

---

\* Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp, parecer 128 /2004–CEP, de 05 de abril de 2004.

Projeto parcialmente financiado pela Fundunesp.

Regras de nomenclatura genética adotadas:

HUGO Gene Nomenclature Committee. [updated March 2007]; cited 26 Apr 2008. Available from: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>.

Splendore A. Para que existem as regras de nomenclatura genética. Rev Bras Hematol Hematoter. 2005; 27,148–52.

mais de 40% dos pacientes ainda poderiam morrer com doença metastática, a despeito do regime terapêutico. Para esses pacientes, propuseram a busca de novas abordagens terapêuticas e indicadores de prognóstico.

Para Wunder et al. (2005), embora a evolução dos pacientes com osteossarcoma tenha apresentado significativa melhora nas duas últimas décadas, ainda não foi possível diminuir o número de pacientes que não respondem ao tratamento. É necessário, ainda, desenvolver novas estratégias terapêuticas e identificar no momento do diagnóstico, os pacientes que potencialmente responderão de modo desfavorável, submetendo-os a propostas terapêuticas diferenciadas.

A apoptose, ou morte celular programada, tem participação importante no desenvolvimento tumoral, determinando crescimento e agressividade (Shibata & Matsubara, 2001; Kelly et al., 2003; Pereira et al., 2003). Para Basu et al. (2006) inibição da apoptose pode constituir aspecto comum a todas as neoplasias, influenciando início, progressão e curso clínico.

Grande número de estudos sobre apoptose busca elucidar o papel da morte celular programada na oncogênese e no tratamento do câncer (Jia et al., 2004). Pesquisas nesse campo têm sido realizadas com freqüência e o índice de apoptose tem sido reportado como indicador de prognóstico para vários tumores, sobretudo carcinomas (Shibata & Matsubara, 2001; Kelly et al., 2003; Pereira, et al., 2003).

O gene supressor *TP53* parece ter importante função no controle do ciclo celular, manutenção da estabilidade genômica, diferenciação celular e apoptose. A mutação do gene *TP53* e a expressão da proteína p53 têm sido relacionadas a múltiplos aspectos na maioria das neoplasias (Jia et al., 2004).

Para Wunder et al. (2005), o gene supressor de tumor *TP53* e a proteína p53 seriam possíveis candidatos a marcadores de prognóstico de osteossarcomas. Grande variedade de tumores, inclusive o osteossarcoma, desenvolve-se na deficiência do *TP53*, considerado um dos genes mais freqüentemente mutado em neoplasias humanas. Em uma grande variedade de

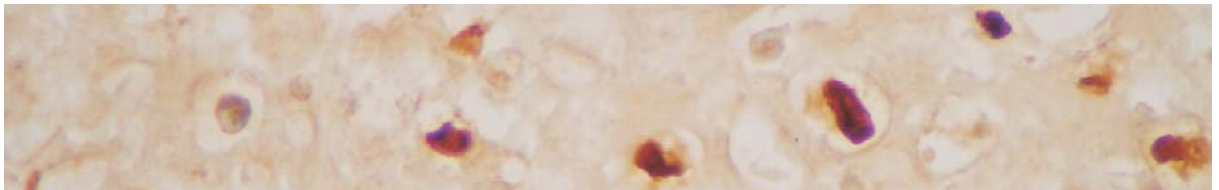
tumores, a mutação do gene *TP53* ou a expressão da proteína p53 são preditivos de fenótipo tumoral mais agressivo e de pior curso clínico.

Grandes esforços têm sido despendidos no delineamento de aspectos moleculares da carcinogênese (Fuchs & Pritchard, 2002). Os últimos avanços, na área da biologia molecular, têm contribuído com valiosas informações acerca dos mecanismos envolvidos no processo tumoral, permitindo a compreensão, cada vez mais detalhada, das inúmeras interações entre os processos que contribuem com a patogênese dos tumores (Fett-Conte & Salles, 2002).

Para Fuchs & Pritchard (2002), o melhor entendimento dos eventos moleculares nos tumores poderá resultar em diagnósticos mais acurados, melhores terapias e projetar prognósticos.

Portanto, considera-se que ampliar o conhecimento e aplicação da biologia molecular pode contribuir para melhorar a compreensão da biologia do osteossarcoma, e propiciar diagnóstico precoce, identificar maus respondedores e, sobretudo, permitir opções terapêuticas mais racionais e efetivas, que aumentem a sobrevida dos pacientes (Hansen, 1991; Wang, 2005).

# Revisão da literatura



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A busca pela identificação de fatores que possam apontar, ao diagnóstico e com precisão, a resposta terapêutica e sobrevida dos pacientes portadores de osteossarcoma tem sido incessante. Presumir a agressividade tumoral, capacidade de invasão tecidual, probabilidade de recidiva, propensão ao desenvolvimento de metástases e resposta ao tratamento, poderá ser valioso expediente na escolha da proposta terapêutica.

Mankin et al. (2004) consideraram impossível definir um único fator que possa prever a evolução dos portadores de osteossarcoma e sugeriram que pacientes com menos de vinte anos de idade, com lesão de pequena dimensão, localizada abaixo do joelho ou do cotovelo, estágio I ou II, com 90% ou mais de necrose tumoral após a quimioterapia neo-adjuvante, provavelmente, apresentarão sobrevida longa. Por sua vez, pacientes com idade mais avançada, com grandes lesões, estágio II ou III, localizadas em região pélvica, fêmur ou úmero proximal e resposta à quimioterapia menor que 90%, apresentariam alto risco de desenvolvimento de metástases e óbito em três anos. Os pacientes com recorrência local ou com metástases ao diagnóstico teriam prognóstico ruim.

As conclusões de Mankin et al. (2004) assemelham-se ao índice de prognóstico, proposto por Taylor et al. (1985), que adotaram como indicadores desfavoráveis: idade menor que dez anos, sexo masculino, tumores maiores que 15 cm, predominância histológica ósteo ou condroblástica, duração dos sintomas igual ou inferior a dois meses e envolvimento do fêmur ou úmero. Os pacientes com cinco ou seis desses indicadores teriam baixa sobrevida. Em contraste, os pacientes com apenas uma ou duas dessas características apresentariam boa evolução clínica.

Apesar da grande quantidade de publicações que apontam, sugerem ou discutem a associação entre vários fatores e prognóstico, atualmente, não há um único fator ou combinação de fatores que possa, acuradamente,

predizer quais pacientes apresentarão boa resposta ao tratamento e, conseqüentemente, maior sobrevida (Wunder et al., 2000; Kubista et al., 2004).

Os fatores mais freqüentemente investigados, como preditivos de prognóstico, nos pacientes portadores de osteossarcoma, são comentados a seguir.

## 2.1 Idade

De acordo com Huvos (1991), 60% dos pacientes com osteossarcoma se situam na faixa etária abaixo de 21 anos. No estudo de Fechner & Mills (1993), 85% deles tinham menos de trinta anos, com 60% entre dez a vinte anos. Varan et al. (2007), encontraram média de idade de 13,3 anos. Petrilli (2005) encontrou 70,7% dos pacientes entre dez e 18 anos, 16,9% com idade menor que dez anos e 12,4% maiores que 18 anos. Uribe-Botero et al. (1977), relataram maior incidência do tumor na segunda década de vida, com 76,5% dos casos ocorrendo em pacientes menores que 25 anos.

Meyers et al. (1992), Pochanugool et al. (1997) e Tomer et al. (1999) não identificaram relação entre idade do paciente e intervalo livre de doença.

Rytting et al. (2000) não identificaram diferença estatisticamente significativa ao compararem intervalo livre de doença e sobrevida de pacientes pré-adolescentes com os de faixas etárias mais altas.

Entretanto, para Taylor et al. (1985), a ocorrência da doença em pacientes com idade menor que dez anos, indica prognóstico desfavorável. Serra et al. (2003) demonstraram ser, significativamente mais alta, a incidência de recorrência e de pior resultados nos pacientes com idade menor que 12 anos. Para Bacci et al. (2006b), idade inferior a 14 anos estaria relacionada a pior prognóstico, em pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades e de alto grau.

Huvos (1986) relatou que pacientes com idade acima de sessenta anos têm pior prognóstico, enquanto Bentzen et al. (1988) identificaram que o aumento da idade piorava o prognóstico. Para Mankin et al. (2004), os pacientes mais idosos têm menor taxa de sobrevida, sobretudo, aqueles acima de 55 anos.

Para Meyers et al. (1992), Bentzen et al. (1988) e Szendroi et al. (2000), os fatores determinantes de pior prognóstico, encontrados nos pacientes maiores de trinta anos, têm relação com a tendência em apresentar tumores localizados no esqueleto axial, maior intolerância às drogas e menor adesão ao tratamento.

Para Grimer et al. (2003), pacientes com mais de quarenta anos portadores de osteossarcomas, podem ser curados pelo tratamento intensivo com quimioterapia e cirurgia. Entretanto, Okada et al. (2004), ao analisarem 64 casos de osteossarcoma, em pacientes acima de cinquenta anos, concluíram que o tratamento quimioterápico não é efetivo para esse grupo e sugeriram novas estratégias terapêuticas.

Bacci et al. (2005a), em amplo estudo com 1.136 pacientes portadores de osteossarcoma de alto grau e tratados com o mesmo protocolo de quimioterapia observaram em 317 pacientes pré-adolescentes e 819 adultos, que a sobrevida, o intervalo livre de doença após cinco anos, a taxa de amputação, o tempo de aparecimento e localização das primeiras metástases e o grau de necrose induzida pela quimioterapia foram semelhantes e concluíram que não há necessidade de se aplicar diferentes tratamentos nesses dois grupos.

## 2.2 Sexo

A maioria dos pacientes portadores de osteossarcoma é do sexo masculino. De acordo com Huvos (1991), na série reportada no Memorial Sloan-Kettering Câncer Center a proporção é de 1,3 pacientes do sexo

masculino para um do sexo feminino e na Clínica Mayo, de 1,6: 1. Klein et al. (1989) encontraram relação de 1,6: 1 e Mankin et al. (2004), 1,15: 1.

Scranton et al. (1975), Taylor et al. (1985), Petrilli et al. (1991) e Ger et al. (1993) relataram maior sobrevida nos pacientes do sexo feminino. Contudo para Meyers et al. (1992), Szendroi et al. (2000), Mankin et al. (2004) e Bacci et al. (2006b), o sexo do paciente não teria valor prognóstico para os portadores de osteossarcoma.

### 2.3 Localização do tumor

Os osteossarcomas localizam-se, mais freqüentemente, nas regiões metafisária distal do fêmur e metafisária proximal da tíbia. Os ossos longos são os mais acometidos, sendo mais freqüentes no fêmur, tíbia, úmero e fíbula (Uribe-Botero et al., 1977; Schajowics, 1982; Huvos, 1991; Marina et al., 2004).

Há controvérsia acerca da relação entre localização e prognóstico em tumores de extremidades. Para Davis et al. (1994), Pochanugool et al. (1997), Tomer et al. (1999), Rytting et al. (2000), Ferrari et al. (2001) e Bacci et al. (2006b), não há associação entre sítio tumoral e sobrevida nos pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades e de alto grau.

Segundo Taylor et al. (1985), o envolvimento do fêmur ou do úmero é indicador de prognóstico desfavorável, enquanto para Goorin et al. (1987), os tumores localizados no úmero proximal têm pior prognóstico. Já Glasser & Lane (1991) relataram que as lesões umerais têm maior probabilidade de melhor sobrevida, e no estudo conduzido por Link et al. (1991), os pacientes com tumores primários localizados na tíbia apresentaram prognóstico mais favorável.

Para Glasser et al. (1992), os tumores localizados no fêmur proximal têm risco de recorrência local três vezes maior que os de localização



distal e, portanto, pior prognóstico e para Szendroi et al. (2000), a localização distal dos tumores é fator de prognóstico positivo.

A localização no esqueleto axial é pouco freqüente, mas associada a pior prognóstico (Bentzen et al. 1988; Meyers et al., 1992; Mankin et al., 2004; Saab et al., 2005). De acordo com Ham et al. (1998), isso ocorreria em decorrência da dificuldade na abordagem cirúrgica, pois, na maioria dos casos, são tumores de maior dimensão, com margens de ressecção exíguas ou até mesmo irressecáveis.

Para Saeter et al. (1997), o pior prognóstico dos pacientes com tumores localizados no esqueleto axial é conseqüência da menor possibilidade da adequada ressecção cirúrgica e de incidirem mais em pacientes idosos, com baixa resposta à quimioterapia.

Para Matsuo et al. (2005), pacientes com tumor localizado no sacro têm pior prognóstico.

## 2.4 Dimensão

A dimensão do tumor é considerada importante fator prognóstico (Taylor et al., 1985; Petrilli et al., 1991; Davis et al., 1994; Szendroi et al., 2000; Bacci et al., 2006b; Petrilli et al., 2006). Para Simon (1978) quanto menor o tumor, melhor o prognóstico.

Bieling et al. (1996) avaliaram radiografias iniciais da região tumoral de 128 pacientes. Dos pacientes que apresentavam tumores menores que 150 cm<sup>3</sup>, apenas 8% desenvolveram metástases, e em pacientes com tumores maiores, a taxa de recidiva foi superior a 40%.

Kaste et al. (2004) analisaram o valor preditivo da dimensão tumoral, mensurada por meio de imagens de ressonância magnética, obtidas na ocasião do diagnóstico. Concluíram que a dimensão tumoral é indicativa de prognóstico e pode discriminar grupos de maior risco para adoção de propostas diferenciadas de tratamento.

Serra et al. (2003) mostraram que a incidência de recorrência e de pior resultado terapêutico é significativamente mais alta nos pacientes com volume tumoral maior que 150ml, ao diagnóstico.

Tumores maiores provavelmente têm maior tempo de evolução ou crescem mais rapidamente, indicando maior agressividade, o que pode interferir no prognóstico. Não há, no entanto, consenso acerca de parâmetros para se estabelecer a partir de qual dimensão tumoral, o paciente terá melhor ou pior prognóstico, porque os métodos de aferição não são uniformes. Da mesma maneira, entre tumores do mesmo tamanho, não é possível prever quais terão curso clínico favorável ou desfavorável.

## 2.5 Classificação

Sob a denominação de osteossarcoma, inclui-se amplo espectro de lesões com aspectos clínicos, anatomopatológicos e comportamento biológico distintos.

Quanto à localização no osso, os osteossarcomas podem ser classificados em centrais e periféricos (Schajowicz, 1993).

Os osteossarcomas centrais são mais comuns, representando mais de 90% dos osteossarcomas (Fechner & Mills, 1993; Damron et al. 2007). Exibem diferentes aspectos, macroscópicos e microscópicos, em razão da destruição óssea e da formação óssea reativa, central e extra-esquelética. Concomitante, apresentam múltiplos estádios de diferenciação das células tumorais que pela capacidade multipotencial podem produzir diferentes tecidos (Schajowicz, 1982).

Os tipos histológicos dos osteossarcomas centrais são: osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, telangectásico, de pequenas células e intra-ósseo bem diferenciado (Schajowicz, 1993).

No tipo osteoblástico, a matriz predominante é o tecido ósseo ou osteóide. No condroblástico, cartilagem hialina ocorre em grande quantidade

concomitante a elementos não condróides. O osteossarcoma fibroblástico é formado por células fusiformes malignas acompanhadas de matriz óssea, com ou sem cartilagem (Raymond et al., 2002).

Embora o tumor com predominância osteoblástica seja referido na maioria dos trabalhos como o mais freqüente, a incidência é variável, provavelmente em função da existência de critérios diagnósticos diferentes.

Segundo Raymond et al. (2002), o tipo osteoblástico representa cerca de 50% dos casos, enquanto o condroblástico e o fibroblástico representam os outros 50%, ambos com 25%.

Petrilli (2005) encontrou 81,3% dos pacientes com tumores de predominância osteoblástica, 11,6%, condroblástica e 3,3%, fibroblástica.

Varan et al. (2007) analisaram 69 tumores, dos quais, 67 (97,1%) eram centrais, sendo 57 do tipo osteoblástico (85%), quatro eram do tipo condroblástico e um, fibroblástico, representando 5,9% e 1,4%, respectivamente.

Uribe-Botero et al. (1977), encontraram 77% de tumores com predominância osteoblástica, 13%, fibroblástica e 9%, condroblástica.

O osteossarcoma telangectásico é caracterizado por numerosos espaços preenchidos por sangue, separados por septos fibrosos. É altamente anaplásico com mínima quantidade de tecido osteóide. É raro e representa de 1% a 5% de todos os osteossarcomas (Huvos, 1991; Fechner & Mills, 1993; Raymond et al., 2002). Apresenta, como característica, alta incidência de fraturas patológicas, documentadas em cerca de 25% dos casos (Raymond et al., 2002).

Na literatura, relata-se que a incidência do tumor de células redondas ou, como também é denominado, osteossarcoma de pequenas células, varia de 1% a 4%, em relação a todos os osteossarcomas (Fechner & Mills, 1993, Kalil & Bridge, 2002, Varan et al., 2007). É constituído por pequenas células malignas, semelhantes às encontradas no sarcoma de Ewing e no linfoma. A produção osteóide pelas células neoplásicas, apesar de focal, é

sempre presente (Fechner & Mills, 1993). Bertoni et al. (1989) e Sim et al. (1979) consideraram que os tumores de células redondas têm pior prognóstico que os osteossarcomas convencionais. Entretanto, para Ayala et al. (1989), o prognóstico é semelhante ou apenas discretamente pior.

O osteossarcoma intra-ósseo bem diferenciado compreende menos de 1% de todos os osteossarcomas e cursa com bom prognóstico (Huvos, 1991; Fechner & Mills, 1993; Wold et al., 2002; Damron et al., 2007).

Para Pochanugool et al. (1997), Tomer et al. (1999), Rytting et al. (2000), Bacci et al. (2006b), a divisão dos osteossarcomas de alto grau, de acordo com a predominância histológica, não é útil como indicador de prognóstico. Segundo Marina et al. (2004), não há evidência de diferença no comportamento clínico, baseada no tipo histológico.

Schajowicz (1982) afirmou que, na maioria dos osteossarcomas, com exceção dos tumores francamente esclerosos, os aspectos macro e microscópicos são tão variáveis que, às vezes, é impossível determinar o tecido predominante; prefere não adotar tal divisão considerando-a inútil, inclusive, para prognóstico.

Entretanto, alguns autores relataram diferenças de prognóstico em função da classificação histológica do tumor. Para Taylor et al. (1985), a predominância osteoblástica ou condroblástica, indicaria prognóstico desfavorável. Da mesma maneira, Goorin et al. (1987) encontraram evolução clínica mais favorável nos pacientes com tumores cuja predominância histológica não era constituída por células osteoblásticas. Bentzen et al. (1998) reportaram melhor evolução clínica nos tumores fibroblásticos, enquanto Szendroi et al. (2000) afirmaram que tumores com menos de 20% de substância cartilaginosa têm melhor prognóstico. Para Bacci et al. (1998b), os tumores condroblásticos são menos sensíveis ao tratamento quimioterápico.

Os tumores periféricos são classificados em paraostal, periostal e de alto grau de superfície, sendo mais raros que os centrais.

O osteossarcoma paraostal é o tipo mais comum dos osteossarcomas de superfície (Unni & Knuutila, 2002; Damron et al., 2007), caracterizando-se por situar-se na superfície externa do osso e pelo alto grau de diferenciação. Acomete mais freqüentemente indivíduos com média de idade maior que a dos pacientes com osteossarcoma convencional. O tratamento é a ablação cirúrgica do tumor, sem necessidade de quimioterapia, com taxa de sobrevida em cinco anos entre 70% a 91% (Okada et al. 1994).

O osteossarcoma periostal é de predominância condroblástica, grau intermediário e acomete a superfície óssea, com predileção pela diáfise dos ossos longos. A tibia é o osso mais acometido, seguido pelo fêmur e úmero. Representa menos de 2% de todos os osteossarcomas (Klein et al., 1989; Schajowicz, 1993; Ayala & Czerniak, 2002; Damron et al., 2007), e é mais freqüente em pacientes com média de idade discretamente maior que aqueles com osteossarcoma convencional e mais baixa que aqueles com paraostal.

Os osteossarcomas dos tipos paraostal e periostal têm melhor prognóstico que o centrais de alto grau (Klein et al., 1989; Huvos, 1991; Fechner & Mills, 1993; Schajowicz, 1993; Ayala & Czerniak, 2002; Unni & Knuutila, 2002). O osteossarcoma de alto grau de superfície, pouco comum, tem o mesmo prognóstico que os osteossarcomas convencionais (Wold et al., 1984).

Osteossarcomas secundários são aqueles que se desenvolvem em ossos com anormalidades pré-existentes tais como doença de Paget, irradiação e outras lesões (Malawer et al., 1989). Têm aspecto histológico semelhante ao do osteossarcoma convencional e são de pior prognóstico (Klein et al., 1989; Forest et al., 2002). Segundo Forest et al. (2002), a incidência de osteossarcoma secundário à radioterapia corresponde a 3,4% a 5,5% de todos os osteossarcomas, enquanto alterações sarcomatosas na doença de Paget ocorrem em 0,7 a 0,9% dos pacientes. Damron et al. (2007) identificaram 1,7% de incidência de osteossarcoma secundário, em pacientes com essa doença.

## 2.6 Estadiamento

Os sistemas de estadiamento são importantes para o planejamento terapêutico, possibilitam comparação entre os diferentes métodos de tratamento e facilitam a troca de informação entre os diversos centros (Eckhardt, 1993).

O sistema mais aceito é o proposto por Enneking e adotado desde 1980 pela Musculoskeletal Tumor Society (Enneking, 1983) e pelo American Joint Committee for Cancer Staging and End Results Reporting (Heare et al. 1989; Dorfman et al., 2002).

Esse sistema considera três características representadas por letras: G, para a graduação histológica; T, para a sede anatômica; e M, para a presença ou ausência de metástases. Possui três níveis designados pelos numerais romanos I, II e III, subdivididos em A, para tumores intracompartimentais e B, extracompartimentais.

De acordo com Heare et al. (1989), dos pacientes com lesão tumoral maligna do sistema músculo-esquelético, aproximadamente, 30% apresentam, ao diagnóstico, tumor no estágio I; 60%, no estágio II e 10%, no estágio III. Os mais frequentes, no estágio I, são os intracompartimentais (66%), enquanto que, no estágio II, são os extracompartimentais (90%).

Pacientes portadores de osteossarcoma no estágio III (doença metastática), ao diagnóstico, tem pior prognóstico o que, para muitos autores, justifica o uso de modalidades terapêuticas mais agressivas (Bacci et al., 1998a, 2000; Wunder et al., 2000; Patiño-Garcia et al., 2003; Mankin et al., 2004; Rech et al., 2004; Mialou et al., 2005; McTiernan et al., 2006; Petrilli et al., 2006). Quando o osteossarcoma se torna metastático, os pulmões são os locais mais frequentemente acometidos (Lane et al., 1986).

Marina et al. (1992) reportaram que a probabilidade de sobrevida em três anos seria de 50% e em quatro anos de 30% nas crianças portadoras

de osteossarcoma com metástases pulmonares ao diagnóstico. Meyers et al. (1993) relataram que, em 62 pacientes portadores de osteossarcoma metastático ao diagnóstico, apenas 11% tiveram sobrevida de vinte meses. Já em estudo conduzido por Bacci et al. (1997), após seguimento médio de 30 meses, 55% dos pacientes mantiveram-se livres de doença após o tratamento.

Metástases ósseas e comprometimento de linfonodos no momento do diagnóstico são raros e relacionados a pior prognóstico (Schajowicz, 1982; Huvos, 1991; Ferguson & Goorin, 2001; Del Prever et al., 2005). Kaste et al. (1999) encontraram apenas 0,5% de metástases ósseas e Tobias et al. (1985) encontraram metástases em linfonodos, em 2,3 % dos casos, com média de sobrevida de 8,5 meses.

As metástases saltatórias são focos de osteossarcoma separados do foco primário, normalmente em local proximal à lesão primária. A ocorrência é relatada entre 1,4% a 6,5% (Sajadi et al. 2004; Kager et al., 2006;). São relacionadas ao aumento de recorrência local e metástases pulmonares (Enneking & Kagan, 1975). Wuisman & Enneking (1990) encontraram taxa de sobrevida desses pacientes semelhante àqueles com estágio IIIB ao diagnóstico. Para Leavey et al. (2003), as metástases saltatórias são raras e indicam prognóstico adverso.

Com o estadiamento é possível estabelecer dois grupos de pacientes com prognósticos diferentes. Os pacientes com tumores classificados como I, bem diferenciados, têm melhor prognóstico e os pacientes com tumores classificados como III, metastáticos, pior prognóstico. No entanto, para a maioria dos pacientes com tumores classificados como II, não é possível prever o prognóstico, o que limita a aplicação do sistema de estadiamento como fator prognóstico.

## 2.7 Tratamento

### 2.7.1 Quimioterapia

O sucesso do tratamento do osteossarcoma requer o uso de tratamento quimioterápico sistêmico (Marina et al., 2004).

Foi com a introdução de agentes quimioterápicos mais efetivos, a partir de 1970, que se obteve crescentes aumentos de tempo livre de doença e da taxa de sobrevida (Rosen et al., 1982; Petrilli, 1988; Ham et al., 1998).

Em estudo de Uribe-Botero et al. (1977) com 243 pacientes com diagnóstico de osteossarcoma tratados somente com amputação, entre 1950 e 1974, a sobrevida, em cinco anos, foi de, apenas, 13%. A maioria dos pacientes falecia em razão de metástases pulmonares com menos de dois anos de diagnóstico, o que sugere que 80% dos pacientes, provavelmente, apresentavam metástases não detectadas ao diagnóstico. Constatou-se que, embora a cirurgia radical e precoce fosse efetiva para o controle local da doença, não se mostrava suficiente em termos de sobrevida.

O grande avanço nos tratamentos propostos foi a introdução do conceito de administração de quimioterapia antes da cirurgia do tumor primário, iniciado por Rosen et al., em 1976. Nesse estudo os pacientes que receberam a quimioterapia pré-operatória apresentaram redução da massa tumoral, o que facilitou a ressecção do tumor com a preservação do membro acometido.

A quimioterapia pré-operatória ou neo-adjuvante possibilitou a agressão precoce a possíveis focos de doença microscópica e, por meio da análise do grau de necrose na peça ressecada, avaliar o efeito das drogas quimioterápicas utilizadas. Está também associada ao aumento do número de cirurgias com preservação do membro acometido e à correspondente diminuição de amputações (Camargo & Caiero, 2002; Croci, 2002, Petrilli, 2006).



A quimioterapia pré-operatória tornou-se o tratamento de escolha para os pacientes portadores de osteossarcoma (Marina et al., 2004). Porém, de acordo com Wunder et al. (2005), apesar da significativa melhora do prognóstico ocorrido nas duas últimas décadas, recentemente, não foram obtidos grandes avanços.

### *2.7.2 Cirurgia do tumor primário*

A cirurgia ainda é o método mais efetivo para o controle local do tumor porque, de maneira geral, o tratamento radioterápico é pouco eficaz (Petrilli, 2005).

Jaffe et al. (2002), após analisarem a evolução de pacientes portadores de osteossarcoma localizado, que receberam somente tratamento quimioterápico, e compará-la com pacientes submetidos à amputação somada à quimioterapia, concluíram que quimioterapia isoladamente é ineficaz no controle do tumor primário. Em resumo, somente 10% dos pacientes obtiveram cura com a quimioterapia isolada, enquanto o tratamento cirúrgico associado à quimioterapia, alcançou taxas de 50% a 65%. Concluíram que não se justifica a opção pela quimioterapia exclusiva.

O tratamento cirúrgico dos tumores ósseos malignos envolve variados e complexos aspectos (Marina et al., 2004). Para obtenção do controle local da doença é preciso que a ressecção do tumor seja realizada sem violação das margens, o que implica em completa remoção do tumor, inclusive da cicatriz da biópsia, envolto em camada de tecido normal e não violado durante a ressecção. Dependendo da localização, tamanho, relação com as estruturas anatômicas vizinhas e invasão tumoral, o controle local pode ser obtido com os procedimentos cirúrgicos que preservam o membro acometido ou por intermédio da amputação (Garcia Filho, 2002b,c).

Historicamente, a amputação e a desarticulação do membro acometido eram os procedimentos mais utilizados para o controle local do

tumor (Garcia Filho, 2002b,c). Atualmente, a opção pela cirurgia de amputação é feita nos casos de tumores muito avançados, geralmente de grande volume, ou que cresceram em vigência do tratamento quimioterápico.

Nas últimas décadas, com a introdução da quimioterapia neoadjuvante, avanços no diagnóstico por imagem, aperfeiçoamento do material de implante e criação dos bancos de ossos, houve significativo avanço no tratamento cirúrgico dos tumores ósseos, com predomínio das cirurgias para a ressecção do tumor com preservação do membro acometido, as chamadas cirurgias conservadoras, sem comprometimento da sobrevida dos pacientes (Consentino, 2002; Garcia Filho, 2002b,c; Marina et al., 2004).

## 2.8 Resposta histológica à quimioterapia pré-operatória

Embora a resposta ao tratamento quimioterápico pré-operatório possa ser avaliada por critérios clínicos, pela ressonância magnética ou por radioisótopos, a avaliação histológica é considerada o método mais preciso (Huvos, 1991).

O sistema de gradação da resposta histológica foi introduzido como proposta de avaliação da extensão da destruição tumoral resultante da quimioterapia pré-operatória. Além de ser indicador de prognóstico, torna possível a comparação e a análise objetiva dos resultados dos tratamentos em diferentes instituições (Huvos et al. 1977; Rosen et al. 1979, 1982).

O método baseia-se na identificação e quantificação das células tumorais necróticas, na peça de ressecção, decorrentes do tratamento quimioterápico. Vários critérios de avaliação são utilizados, como os propostos por Huvos (Rosen et al., 1976, 1979, 1982; Huvos, 1991), Ayala (Ayala et al., 1984; Raymond et al., 1987) e Picci et al. (1985).

Huvos dividiu a resposta ao tratamento em quatro graus, sendo: grau I, pouco ou nenhum efeito quimioterápico; grau II, resposta parcial com

áreas de tumor viável; grau III, mais de 90% de necrose; e grau IV, ausência de célula tumoral viável (Rosen et al., 1976, 1979, 1982; Huvos, 1991).

De maneira semelhante, Ayala definiu três graus, subdivididos em A e B: grau IA, nenhum efeito e necrose menor que 30%; IB, efeito duvidoso, com 40% de necrose; IIA, efeito parcial, com 40% a 50% de necrose; IIB, 40% a 50% de destruição tumoral; IIIA, peça de ressecção com 60% a 90% de necrose; e IIIB, efeito quimioterápico completo (Ayala et al., 1984; Raymond et al., 1987).

Picci et al. (1985) classificou o efeito da quimioterapia em bom, moderado e pobre, de acordo com o percentual de necrose: maior que 80%; entre 50% e 80% e menor que 50%, respectivamente.

A importância do sistema de gradação histológica como fator preditivo de prognóstico é amplamente reconhecida. Em geral, quando na peça de ressecção, encontra-se mais de 90% de necrose, o prognóstico é melhor que naqueles com menos de 90% (Bieling et al., 1996; Provisor et al., 1997; Bacci et al., 1998b, 2001, 2006b; Szendroi et al., 2000; Entz-Werle et al., 2003; Mankin et al., 2004; Rech et al., 2004; Petrilli et al., 2006).

Para Raymond et al. (1987), Davis et al. (1994) e Bielack et al. (2002), a resposta ao tratamento quimioterápico neo-adjuvante é o melhor indicador de prognóstico e, para Mankin et al. (2004), grau de necrose superior a 90% está relacionado com maior sobrevida.

Bacci et al. (2005c) avaliaram 881 pacientes com osteossarcomas não metastáticos de extremidades, tratados na mesma instituição, entre 1983 e 1999, submetidos a cinco diferentes protocolos de tratamento e concluíram que a necrose induzida pela quimioterapia é importante fator de prognóstico, independentemente do tipo de quimioterapia aplicada antes da cirurgia.

No entanto, Zunino & Johnston (2000), em estudo retrospectivo com 18 pacientes portadores de osteossarcoma, não identificaram relação entre a quantificação da necrose induzida pela quimioterapia e o prognóstico. Rytting et al. (2000), em estudo com pré-adolescentes não identificaram

diferença significativa no intervalo livre de doença e sobrevida, entre os considerados bons respondedores e aqueles com menor índice de necrose tumoral pós-quimioterapia.

Embora a resposta à quimioterapia seja muito utilizada como indicador de prognóstico, seu valor é limitado, pois não pode ser considerada ao diagnóstico e, com raras exceções, as terapias alternativas pós-operatórias não alteraram o curso clínico da doença nos casos em que a resposta à quimioterapia pré-operatória foi insuficiente (Meyers et al., 1992; Man et al., 2005).

## 2.9 Outros fatores

Alguns autores consideraram que a elevação dos níveis séricos de fosfatase alcalina é preditiva de mau prognóstico em pacientes portadores de osteossarcoma (Bacci et al., 1987, 2002c, 2006b; Gajewska et al., 2004; Bramer et al., 2005), porém para Rytting et al. (2000) e Ferrari et al. (2001), essa associação é inexistente. Em relação a desidrogenase láctica sérica, Pochanugool et al. (1997); Bacci et al. (2004a) e Rech et al. (2004) encontraram associação entre níveis elevados e pior prognóstico, enquanto, Tomer et al. (1999) e Rytting et al. (2000) não obtiveram resultado semelhante.

As alterações cromossômicas encontradas em pacientes com osteossarcomas acometem, com maior frequência, as regiões cromossômicas 8q, 17p12, 13q14 e 13q21. Segundo Trieb & Kotz (2001), tais aberrações não estão associadas ao curso clínico e à resposta à quimioterapia e seu eventual valor prognóstico precisa ser confirmado com mais estudos.

O gen *ABCB1* (*ABC*, sub-família *B*, membro *1*) também denominado *CLCS*; *MDR1*; *PGP*; *PGY1*; *ABC20*; *CD243*; *GP170* codifica a proteína denominada P-gp (HUGO, 2007). Baldini et al. (1995), Serra et al. (1995) e Hornicek et al. (2000) encontraram associação entre aumento do

nível de P-gp nas células tumorais, com aumento da taxa de recidiva e diminuição do intervalo livre de doença. Pakos & Ioannidis (2003) não observaram tal associação e ressaltam que resultados diferentes poderiam ser conseqüência da heterogeneidade da metodologia e das técnicas de quantificação da proteína.

O gene retinoblastoma (gene *RBI*), localizado no braço longo do cromossomo 13, (13q14.1-q14.2), cuja inativação leva ao desenvolvimento do retinoblastoma, foi o primeiro gene supressor de tumor identificado (Gleich & Salamone, 2002; HUGO, 2007), tendo sido relatado como fator de pior prognóstico (Merimsky et al., 2003; Patiño-Garcia et al., 2003). Para Grundmann et al. (1995), o valor prognóstico do gene *RBI* precisa ser ainda elucidado.

Os genes *ERBB* constituem família composta por quatro membros, numerados de um a quatro. Codificam a proteína homóloga dos receptores de crescimento epidérmico que, quando ligada à porção externa dos receptores transmembrânicos, ativam as proteínas da cascata da divisão celular. O mais conhecido deles é o *HERBB2* que também é denominado *NEU*; *NGL*; *HER2*; *TKR1*; *HER-2*; *c-erb B2*; *HER-2/neu* e está localizado no braço longo do cromossomo 17, (17q11.2-q12) (HUGO, 2007).

Ferrari et al. (2004) avaliaram o nível celular de *ERBB2* em biópsias de tumor primário e de metástases pulmonares em 19 pacientes com osteossarcoma de alto grau. Os pacientes com metástases pulmonares exibiram maior expressão celular do *ERBB2*. Para Zhou et al. (2003), a expressão do *ERBB2* nos pacientes está associada a menor intervalo livre de doença.

O *ERBB4* está localizado no braço longo do cromossomo 2, (2q33.3-q34) (HUGO, 2007). Merimsky et al. (2003) verificaram que a expressão de *ERBB4* mostrou significativa associação com baixa resposta histológica e menor intervalo livre de doença.

Os genes pertencentes à família *MMP* e o gene *MDM2* mostram associação ao prognóstico, sendo que para Uchibori et al. (2006), o aumento da expressão de *MMP14* (*MT1-MMP*), associa-se a pior prognóstico. A amplificação de *MDM2* pode inativar a proteína p53 e está associada à recorrência da doença e a osteossarcomas metastáticos, como relatado por Ladanyi et al. (1993), resultado não confirmado por Nakayama et al. (1995).

## 2.10 O gene *TP53* e a proteína p53

A proteína p53 foi identificada em 1979, co-precipitada com o antígeno T em fibroblastos de hamster, transformados pelo vírus oncogênico SV40 (simiun vírus 40). Trata-se de fosfoproteína nuclear com 393 aminoácidos, peso molecular de 53 mil daltons ou 53kD (McBride et al., 1986; Diller et al., 1990; Lopes et al., 1999; Fett-Conte & Salles, 2002; Klumb & Cavalcanti Júnior, 2002). Tem como principal função a preservação da integridade do código genético das células. Garante a manutenção da mesma seqüência de nucleotídeos ao longo da molécula de DNA presente em cada célula do organismo (Pinho, 2000). Mantém a homeostase dos tecidos, isto é, controla o número e o comportamento das células do organismo. Tipicamente regula um ou mais processos que previnem as proliferações aberrantes e age em resposta a diversas formas de estresse celular, mediando grande variedade de processos antiproliferativos (Fridman & Lowe, 2003).

A inativação da proteína p53 é o evento mais comum encontrado na gênese do câncer. A relação entre proteína p53 e carcinogênese tem sido amplamente comprovada pela identificação do aumento de expressão da proteína mutante em tumores malignos de diferentes tecidos do organismo (Yamaguchi et al., 1992, 1997; Pinho, 2000; Fett-Conte & Salles, 2002; Fridman & Lowe, 2003).

A proteína p53 é codificada pelo gene *TP53* (proteína tumoral p53), localizado no braço curto do cromossomo 17 (locus 17p13.1); é constituída por cerca de 20kb de DNA e possui 11 exons (Chang & Syrjanen, 1995).

Alterações desse gene são, freqüentemente, encontradas em amplo espectro de neoplasias e seu envolvimento, direto ou indireto, tem sido observado na etiopatogenia de quase todas as neoplasias humanas. As mutações do gene *TP53* estão presentes em tumores das linhagens epitelial, mesenquimal, hematopoiética, linfoproliferativa e em tumores do sistema nervoso central (Wadayama et al., 1993; Patiño-Garcia & Ariznabarreta, 1997; Lopes et al., 1999; Fett-Conte & Salles, 2002).

Por codificar proteínas capazes de regular o crescimento celular e seu bloqueio poder acarretar desenvolvimento de tumores, o gene *TP53* é classificado como gene supressor de tumor (Hollstein et al., 1994; Meyn, 1995).

Quando ocorre lesão no DNA, o gene *TP53* é ativado e faz a transcrição da proteína p53. O acúmulo dessa proteína no núcleo da célula inibe o ciclo mitótico no início da fase G1 e ativa a transcrição de genes reguladores, disparando diferentes respostas biológicas como, interrupção no ciclo celular e correção da mutação, apoptose, senescência e diferenciação gênica (Miyashita & Reed, 1995; Pinho, 2000; Klumb & Cavalcanti Júnior, 2002; Bykov & Wiman, 2003; Fridman & Lowe, 2003). A proteína p53 garante a manutenção da integridade do genoma e o controle da proliferação celular, impedindo a propagação do erro genético para as células filhas (Miyashita & Reed, 1995; Pinho, 2000; Klumb & Cavalcanti Júnior, 2002; Bykov & Wiman, 2003).

Ausente o controle, a progressão do ciclo celular ocorre de forma inapropriada, permitindo a sobrevivência de células que, em condições normais, estariam destinadas a morrer. As células mutantes não sofrem apoptose, vivem mais tempo, acumulam mais mutações e multiplicam-se sem controle (Diller et al., 1990; Fridman & Lowe, 2003).

O sistema de funcionamento do gene *TP53* geralmente permanece inativado e torna-se ativo apenas quando as células sofrem alguma agressão. Portanto, a proteína p53 é encontrada em quantidades mínimas nas células sob condições normais e tem meia vida curta, não sendo detectada na maioria dos tecidos normais (Vogelstein et al., 2002).

Ao exercer a função de detecção de alterações no DNA, com conseqüente correção ou indução da morte celular, a proteína p53 é das mais importantes dentre as proteínas reconhecidamente envolvidas em processos de carcinogênese do organismo (Sameshima et al., 1996; Yamaguchi et al., 1997).

Ao contrário dos outros genes supressores de tumor, que são inativados por perda alélica, o gene *TP53* distingue-se pela alta freqüência de mutações. A maior parte dessas mutações estão localizadas entre os aminoácidos 110 e 307 e entre os exons cinco e oito (Hollstein, 1994). A maior parte é composta pelo tipo *missense* (troca de um nucleotídeo) e altera a função normal da proteína p53. Como resultado das mutações pontuais, essa proteína tem meia vida prolongada, acumulando-se nas células tumorais. Embora em menor freqüência, as mutações também podem ser do tipo *nonsense*, em virtude de deleção de partes do gene ou inserção de nucleotídeos. Esse tipo de mutação pode levar à interrupção da leitura do RNA mensageiro e propiciar a ocorrência de proteínas defeituosas (Klumb & Cavalcanti Júnior, 2002).

Embora a maioria das mutações ocorra em células somáticas, analogamente ao gene do retinoblastoma, também pode ocorrer em células germinativas com conseqüente desenvolvimento de neoplasias familiares. Exemplo clássico é a rara síndrome de Li-Fraumeni, cujo padrão de herança é autossômico dominante, em que os indivíduos herdam um alelo mutante, predispondo o portador a tumores malignos, mais comumente, tumor cerebral, sarcomas (inclusive osteossarcomas), leucemias e carcinoma adrenocortical. O gene *TP53* mutante pode ser observado em cerca de 75% dessas famílias,



com aumento do nível da proteína p53 em tecidos normais e neoplásicos (Porter et al., 1992; Hung & Anderson, 1997; Fett-Conte & Salles, 2002; Fuchs & Pritchard 2002; Wunder et al., 2005).

Em virtude do importante papel no controle e desenvolvimento de neoplasias, o gene *TP53* tem sido, mais recentemente, alvo de pesquisas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. A resistência dos tumores ao tratamento pode ser induzida pela mutação desse gene (Tsang et al., 2003; Bykov et al., 2005; Bouchet et al., 2006; Maeda et al., 2006; Zhu et al., 2006).

A inativação da proteína p53 pode impedir a apoptose e originar a resistência tumoral ao tratamento quimioterápico. Alternativas terapêuticas genéticas e farmacológicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de restaurar a função e o controle da proteína p53 de pacientes com câncer (Lowe et al., 1994).

Estudos com cultura de células humanas e em vários modelos de tumores, em camundongos, mostraram que a inativação da proteína p53 reduz ou inibe a apoptose induzida pela quimioterapia (Bykov et al., 2005). Isso poderá ter importância clínica nos osteossarcomas, pois a efetividade da quimioterapia é determinante para a evolução do paciente (Wunder et al., 2005).

Muitos estudos indicam que as células tumorais ligadas à proteína p53 mutante são de fato mais resistentes à quimioterapia. A introdução de cópia intacta do gene *TP53* em cultura de células humanas tumorais carregadas com p53 mutante, produz resposta apoptótica significativa em muitos casos. Conseqüentemente, a reconstituição da p53 selvagem poderá ser estratégia para obtenção de células tumorais mais responsivas à quimioterapia e melhor efeito terapêutico (Bykov & Wiman, 2003).

Essas novas propostas de tratamento, baseadas em terapia gênica, trazem renovadas expectativas de tratamentos mais eficientes e redução dos

efeitos indesejados das drogas quimioterápicas atualmente utilizadas (Bykov et al., 2005).

### ***2.10.1 Gene TP53, proteína p53 e osteossarcoma***

Yokoyama et al. (1998), pesquisaram alterações genéticas em 17 pacientes com osteossarcoma de alto grau e concluíram que a mutação do gene *TP53* pode interferir na progressão do tumor, mas não encontraram associação entre resposta à quimioterapia e sobrevida desses pacientes.

Para Diller et al. (1990), as mutações no gene *TP53* estão associadas a grande variedade de tumores humanos, incluídos os osteossarcomas. Mostraram que o gene que codifica a proteína p53 bloqueia o crescimento das células de osteossarcomas e que este tipo de tumor possui numerosas alterações genéticas, sendo a deleção do braço curto do cromossomo 17, onde se localiza o gene *TP53*, uma das mais comuns. Encontraram alterações detectáveis no gene *TP53* em nove de dez linhagens celulares de osteossarcoma e relação entre expressão aumentada da proteína p53 selvagem e limitação de crescimento das células de osteossarcoma in vitro.

Miller et al. (1990) encontraram alterações no gene *TP53* em 11 (18%), de sessenta pacientes com osteossarcoma, mas não em outros cinquenta tipos de sarcomas. Cerca de 50% de linhagens celulares de osteossarcoma apresentaram rearranjos grosseiros no gene *TP53*. Concluíram que os rearranjos poderiam ser a causa da perda de restrição normal ao crescimento celular nos osteossarcomas.

Para Hansen (1991), embora a relativa raridade do osteossarcoma traga dificuldade para os estudos genéticos, a origem do osteossarcoma poderia ser resultado da ação coordenada de perda da função dos genes supressores *RB1* e *TP53*.

Chandar et al. (1992), analisaram a estrutura e a expressão do gene *TP53* e *RBI* em culturas de células de osteossarcoma humano e de rato e concluindo que a inativação do *TP53* é importante para o desenvolvimento do osteossarcoma.

Strauss et al. (1992) estudaram o gene *TP53* em osteossarcoma murino induzido por irradiação e em culturas de células de osteossarcoma e encontraram alterações na região do gene *TP53* em 18 dos 31 tumores e em oito das nove culturas.

Toguchida et al. (1992), analisaram o espectro de mutação do gene *TP53* em 127 sarcomas ósseos e de partes moles com várias classificações histológicas e descreveram 42 alterações do gene *TP53*, heterogêneas em distribuição e tipo de mutação, em contraste com os achados de outros tipos de câncer, nos quais as mutações são mais homogêneas.

Yamaguchi et al. (1992) investigaram o envolvimento de genes supressores de tumor na gênese do osteossarcoma em amostras teciduais de tumor de 37 pacientes e identificaram perda de alelo em 36 dos 37 braços cromossômicos estudados. Em quatro regiões (3q, 13q, 17p e 18q) constataram perda de alelos em mais de 60% dos casos estudados, o que demonstrou que além do gene *RBI* (13q) e do gene *TP53* (17q), os outros dois genes supressores também podem estar envolvidos no desenvolvimento do osteossarcoma. Além disso, os tumores com perda de alelo no locus 17q apresentaram maior tendência ao desenvolvimento de metástases nos pulmões mais precocemente que aqueles sem perda de alelo.

Ueda et al. (1993) investigaram, pelo método imuno-histoquímico, a expressão da proteína p53 em 18 osteossarcomas e quarenta outros tumores malignos e benignos. Em 12 amostras (67%) de osteossarcomas a reação foi positiva, o que indicou presença de proteína mutante.

McIntyre et al. (1994) verificaram a possibilidade de crianças com osteossarcoma apresentarem mutações no gene *TP53*. Obtiveram amostras de sangue periférico de 235 crianças, com a finalidade de verificar se esse tipo

de análise poderia ser teste preditivo de larga escala. Em apenas sete casos (3%) foram identificadas mutações no gene *TP53*.

Guo et al. (1996) analisaram a expressão da proteína p53 em 46 pacientes portadores de osteossarcoma por método imuno-histoquímico. A amostra foi constituída de 32 pacientes do sexo masculino e 14 do sexo feminino, com média de idade de 20,6 anos. Oito desses pacientes apresentavam metástases pulmonares, 27 (58,7%) das 46 espécimes de osteossarcoma apresentaram reação fortemente positiva, indicativa de aumento da expressão da proteína p53.

Miller et al. (1996) estudaram a ocorrência de alterações no gene *TP53*, em amostras de osteossarcomas e encontraram mutações pontuais em 13 de 42 e rearranjos grosseiros em cinco de 37 amostras.

Mousses et al. (1996) examinaram a ocorrência de anormalidades no gene *TP53* em tumores ósseos e de partes moles. Das 113 amostras examinadas, em 16 foram identificadas mutações. A frequência dessas alterações foi observada, predominantemente, em osteossarcomas (8/34), rabdomyosarcomas (2/3), sarcoma de Ewing (1/5), lipossarcomas (3/21) e fibro-histiocitoma maligno (2/34). Dezesesseis pacientes apresentaram lesões metastáticas, mas, apenas um apresentou mutação no gene *TP53*. Comparando o método imuno-histoquímico para expresso da proteína p53 com a ocorrência de anormalidades no gene *TP53*, verificaram, em oito dos nove tumores com mutação no gene *TP53*, incremento da expressão da proteína p53.

Pompetti et al. (1996) investigaram a estrutura e expressão de vários oncogenes em osteossarcoma (36 amostras de 34 pacientes), tumores de células gigantes (dez pacientes) e condrossarcoma (18 pacientes), com o objetivo de identificar as eventuais alterações genéticas associadas. Foram detectadas alterações no gene *RBI* e *TP53* somente nos osteossarcomas.

Bodey et al. (1997) utilizaram antígenos imuno-histoquímicos em investigação sobre a ocorrência de proteína p53 mutante em 43 amostras de osteossarcomas primários. Houve detecção em todos os 43 osteossarcomas

primários. Os autores sugeriram que alterações na proteína p53 podem ser detectadas precocemente pelo método imuno-histoquímico em várias neoplasias humanas, inclusive, osteossarcomas.

Lonardo et al. (1997) analisaram a expressão da proteína p53 em 83 amostras de osteossarcoma e a possível relação com evolução clínica. A positividade foi encontrada em 26,5% dos tumores analisados, e a expressão da proteína não foi associada à taxa de proliferação.

Patiño-Garcia & Ariznabarreta (1997) analisaram 64 amostras de osteossarcoma de 38 pacientes pediátricos e encontraram mutação no gene *TP53* em 18,4% das amostras. Concluíram que mutações no gene *TP53* podem estar envolvidas no desenvolvimento de osteossarcomas em crianças e, talvez, indiquem diminuição do tempo de sobrevivência.

Hasegawa et al. (1997) examinaram a diferenciação e a atividade proliferativa em trinta amostras de osteossarcoma e encontraram expressão aumentada da proteína p53 em seis amostras, associadas à intensa atividade proliferativa. Sugeriram possível associação entre proliferação celular e expressão da p53. Para os autores, a alteração do gene *TP53* pode ser indutora de transformação e proliferação neoplásica.

Papai et al. (1997) examinaram a possível relação entre a expressão da proteína p53 e resposta ao tratamento, em 21 pacientes com osteossarcoma de alto grau. De acordo com o estadiamento de Enneking, 17 tumores (81%) eram IIB e quatro (19%) IIA. A coleta de material para verificação da expressão da proteína p53 foi realizada antes do início do tratamento e após dez semanas, no momento da cirurgia. O prognóstico foi pior em dois pacientes com proteína p53 positiva no material colhido antes do tratamento e em outros três que se tornaram positivos durante a quimioterapia. Esses pacientes morreram um ano após o início do tratamento. Os pacientes que apresentaram proteína p53 negativa em ambas as coletas permaneceram vivos após três anos e meio, enquanto todos os pacientes que mostraram algum tipo de positividade na expressão da proteína p53 na biopsia

inicial não responderam à quimioterapia. Em contraste, nove de 13 indivíduos que não exibiram expressão da p53 na biópsia inicial responderam bem ou de maneira intermediária à quimioterapia. Concluíram que a expressão da proteína p53 pode ser usada como fator prognóstico do osteossarcoma e que, talvez, seja útil para identificar pacientes que necessitem de tratamento mais agressivo.

Goto et al. (1998) analisaram 32 casos de osteossarcoma convencional e não encontraram relação evidente entre sensibilidade à quimioterapia e expressão da proteína p53.

Radig et al. (1998) não encontraram diferença de comportamento clínico entre tumores com mutação da proteína p53 quando comparados aos tumores sem mutação. Sugeriram que, embora as mutações sejam importantes na origem dos osteossarcomas, não causam impacto na progressão da doença.

Para Asada et al. (1999), que investigaram a relação entre expressão da proteína p53 e resistência à cisplatina em culturas de células de osteossarcoma, a deleção do gene *TP53* e a expressão diminuída da proteína p53 selvagem estão associadas ao aparecimento de resistência à cisplatina.

Gorlick et al. (1999) realizaram estudo imuno-histoquímico em 53 pacientes portadores de osteossarcoma tratados no Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, entre 1986 e 1993 e não encontraram associação entre expressão da proteína p53 com a resposta histológica à quimioterapia pré-operatória e com o intervalo livre de doença.

Da mesma maneira, Serra et al. (1999), em análise de 64 osteossarcomas primários e 11 metastáticos, não demonstraram relação entre mutação do gene *TP53* e evolução clínica.

Kakar et al. (2000) estudaram a expressão da proteína p53 em treze casos de osteossarcoma e não identificaram associação entre expressão da p53 e resposta à quimioterapia.

Oda et al. (2000) avaliaram a expressão da proteína p53 em biópsias do tumor primário e de lesões metastáticas, em 25 casos de

osteossarcoma. A amostra foi constituída por 14 pacientes do sexo masculino e 11 do sexo feminino, com média de idade de 16 anos e tempo de seguimento de 37 meses (dez a 145 meses). As lesões primárias foram tratadas com cirurgia e quimioterapia. Sete casos apresentavam expressão aumentada da p53 no sítio primário. Não foi observada relação entre a expressão da proteína p53, o tipo e o grau histológico e tempo de aparecimento de metástases, prognóstico ou proliferação nuclear.

Tsuchiya et al. (2000) examinaram alterações no gene *TP53*, em trinta pacientes com osteossarcoma e em 24 com sarcoma de Ewing. Foram encontradas alterações no gene *TP53* em 15 (50%) dos 30 pacientes com osteossarcomas e em apenas um (3%) dos 24 com sarcoma de Ewing. Por sua vez, Uozaki et al. (2000) analisaram amostras de setenta pacientes com idade inferior a trinta anos, portadores de osteossarcoma convencional, observando que a presença de expressão aumentada da proteína p53 foi considerada fator de mau prognóstico.

Gokgoz et al. (2001), com o objetivo de investigar o papel da mutação do gene *TP53* no desenvolvimento e progressão do osteossarcoma, analisaram espécimes de 247 pacientes com osteossarcoma primário localizado e de 25 pacientes com osteossarcoma metastático ao diagnóstico. A frequência total de mutações foi de 22%, sendo que a mutação do gene *TP53* não foi diferente entre os pacientes que apresentaram doença localizada e aqueles que apresentavam metástases ao diagnóstico, indicando que não é evento tardio na progressão do osteossarcoma, pois já é evidente antes do desenvolvimento de metástases.

Park et al. (2001) avaliaram, em 52 espécimes de osteossarcoma, a expressão da p53 e da glicoproteína P (P-gp). Para esses autores, a co-expressão da p53 e P-gp é forte indicador de menor sobrevida.

Para Trieb & Kotz (2001), a expressão da proteína p53 não é preditiva do prognóstico.

Kawaguchi et al. (2002) analisaram 23 casos de osteossarcoma em pacientes com quarenta anos de idade ou mais e verificaram a presença de mutação do gene e a expressão da proteína p53, observando que todos os casos com mutação da p53 mostraram comportamento agressivo da doença e pior sobrevida.

Entz-Werle et al. (2003) estudaram 54 pacientes portadores de osteossarcoma e concluíram que alterações nas regiões cromossômicas correspondentes aos genes *RB1* e *TP53*, não têm significado prognóstico.

Patiño-García et al. (2003) analisaram a eventual associação entre prognóstico e alterações genéticas em crianças espanholas portadoras de osteossarcoma. Avaliaram amostras de sangue periférico de 76 pacientes e material de biópsia de 41 deles e observaram perda da heterozigosidade nos genes *RB1* e *TP53*. A alteração em *RB1* foi associada à baixa sobrevida e pequeno intervalo livre de doença. Os autores concluíram que os genes *RB1*, *TP53* e possivelmente, outros genes supressores de tumor localizados em 18q estão envolvidos na carcinogênese do osteossarcoma.

Ferrari et al. (2004) avaliaram a expressão da proteína p53 em biópsias de tumor primário e de metástases pulmonares de pacientes portadores de osteossarcoma. Presença de coloração positiva foi notada em 32% das biópsias dos pacientes com metástases pulmonares, porcentagem mais alta que a observada em biópsias do tumor primário. Intervalo livre de doença, em três anos, foi obtido em 64% dos pacientes com p53 negativo e em apenas 17 pacientes com p53 positivo.

Pakos et al. (2004), considerando que estudos sobre a possível relação entre a proteína p53 e o gene *TP53* com resposta à quimioterapia e evolução clínica eram inconclusivos, realizaram estudo de revisão sistemática com metanálise de 16 estudos e 499 pacientes, mostrando que alterações no gene *TP53* foram associadas à pior sobrevida. Quanto à expressão da proteína p53, a associação foi negativa.



Park et al. (2004) estudaram 21 casos de osteossarcoma central de baixo grau e analisaram mutações do gene *TP53*, concluindo que o número de alterações no gene *TP53* em osteossarcomas central de baixo grau é menor, comparado ao de osteossarcomas de alto grau.

Para Wunder et al. (2005) as mutações do gene *TP53* têm sido associadas à resistência à quimioterapia e mau prognóstico em diferentes malignidades. Estudaram 196 pacientes, de sete instituições, com osteossarcoma de alto grau, não metastáticos, em extremidades, com média de seguimento de 44 meses e não encontraram evidência de que a mutação de *TP53* tenha valor preditivo para o desenvolvimento de metástases, em osteossarcomas de alto grau.

Embora a maioria dos autores tenha encontrado associação entre mutação do gene *TP53* e alterações na proteína p53 com o desenvolvimento do osteossarcoma, os resultados apresentados, consideravelmente variados e, aparentemente, conflitantes, tornam controversa a importância prognóstica dessas alterações.

## 2.11 O processo apoptótico

A apoptose é a forma fisiológica, normal e programada, da morte celular que, juntamente com a mitose, controla o número de células do tecido vivo (Jordão & Andrade, 2000). Assim, como é preciso gerar novas células para manter os processos vitais, é imprescindível eliminar as supérfluas ou defeituosas. Portanto, a homeostasia do organismo é controlada, não somente pela proliferação e diferenciação celular, mas, também, pela morte das células. A decisão para seguir com a divisão, quiescência ou morte, depende de fatores endógenos e exógenos que atuam em sinergia (Louro, 2002).

A morte celular, definida como perda irreversível da estrutura e funções vitais da célula ocorre por dois processos distintos, a apoptose e a necrose (Parolin & Reason, 2001).

O fenômeno apoptótico está presente, tanto na fase do desenvolvimento embrionário quanto no organismo adulto. Por meio da apoptose o organismo elimina tecidos provisórios, remove células supérfluas, gera ductos e orifícios orgânicos, remodela tecidos e suprime as células desnecessárias, danificadas, redundantes e potencialmente perigosas (De Roberts & Hib, 2001).

A característica da apoptose, que a diferencia da necrose, é a ausência de inflamação. Durante sua ocorrência, há redução do volume celular, condensação e marginalização da cromatina nuclear, formação de bolhas na membrana plasmática e fragmentação do DNA (Wijsman et al., 1993). A fagocitose ocorre sem que haja liberação de restos celulares para o espaço extracelular, pois, são reconhecidos pelos macrófagos e fagocitados antes da desintegração. Não há inflamação, alteração do microambiente celular e nem lesão dos tecidos, o que garante seu funcionamento normal (Wijsman et al., 1993). É, portanto, diferente da necrose, na qual as membranas citoplasmáticas e nucleares fragmentam-se e liberam conteúdo para o meio externo (Gavrieli et al., 1992; Horta & Young, 1999). A necrose tem por característica a perda da integridade da membrana plasmática com alteração do gradiente eletroquímico, que estimulam a resposta inflamatória e ampliam a lesão tecidual (Parolin & Reason, 2001).

Embora diversos estímulos possam desencadear o processo apoptótico, os mecanismos intracelulares que induzem a morte celular são similares (Schwartzman & Cidlowski, 1993; Louro, 2002).

Lesão irreversível do DNA, alterações nas vias metabólicas, supressão de substâncias indutoras da multiplicação celular, como fatores de crescimento e determinados hormônios, são alguns dos estímulos, provenientes tanto do espaço intra como do extracelular, capazes de iniciar a cascata de eventos que resulta na morte celular (Parolin & Reason, 2001; Louro, 2002).

Duas famílias de proteínas, Bcl-2 e caspases, desempenham papel crítico na regulação e desenvolvimento do processo apoptótico. Foram identificados pelo menos 15 membros da família das proteínas Bcl-2 que é constituída de membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bcl-xs, Bad, wBid) e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-w). Os principais antagonistas da apoptose, Bcl-2 e Bcl-xL agrupam-se, geralmente, na região externa da membrana mitocondrial. Os membros pró-apoptóticos são, normalmente, encontrados na matriz citoplasmática e quando ativados, se deslocam para a mitocôndria, alteram o gradiente de permeabilidade da membrana mitocondrial e liberam proteínas pró-apoptóticas, tais como o citocromo-c, o fator indutor de apoptose e as pró-caspases (Parolin & Reason, 2001; Singhal et al., 2005; Basu et al., 2006; Zinkel et al., 2006).

As caspases (*cysteine-aspartic-acid-proteases*) constituem grupo de enzimas com resíduo de cisteína e especificidade para resíduos de ácido aspártico. As caspases iniciadoras, (caspase dois, oito, nove e dez), ativam as formas inativas das caspases efetoras, (caspase três, seis e sete), que ativam enzimas que destroem a célula (Lodish et al. 2002; Singhal et al., 2005).

Uma vez ativada, a maioria das caspases catalisa a ativação de diversos outros membros desse grupo, com amplificação da cascata proteolítica e degradação de grande variedade de proteínas e substratos importantes à viabilidade celular, sendo essa a fase de execução da apoptose propriamente dita (Parolin & Reason, 2001; Fridman & Lowe, 2003).

Esse processo, altamente complexo, envolve, pelo menos, duas vias, a extrínseca e a intrínseca, com refinado sistema em cascata regulado em múltiplos níveis, observando-se muitas vezes, simultaneamente, diferentes vias apoptóticas em uma mesma célula (Fan et al., 2005; Fayette & Blay, 2005).

A proteína p53 serve como regulador do processo apoptótico modulando os pontos chaves de controle de ambas as vias (Fridman & Lowe, 2003; Fayette & Blay, 2005).

Para Saini & Walker (1998), a regulação do número de células é o objetivo crítico da homeostase, obtida por meio de seletivo controle da apoptose, mitose e diferenciação.

A falha da célula em entrar em apoptose está envolvida na patogenia de inúmeras doenças. Vários tumores humanos já foram relacionados ao desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose, sendo a inibição da morte celular, por apoptose, considerada evento freqüente em várias neoplasias e importante na carcinogênese (Clem et al., 1991). Segundo Lopes (1999) a tumorigênese é resultado do desequilíbrio entre as células geradas pela divisão celular e as eliminadas pela apoptose.

### ***2.11.1 Apoptose e neoplasias***

Apenas três artigos sobre a relação entre apoptose e prognóstico em pacientes portadores de osteossarcoma foram relatados na literatura.

Pompetti et al. (1998) publicaram o primeiro trabalho que pesquisou a eventual relação entre a apoptose e o prognóstico do osteossarcoma. Examinaram 18 amostras de osteossarcoma primário e metastático com o objetivo de identificar a ocorrência de apoptose, verificada por meio da imuno-histoquímica e também a condição do gene *TP53*, pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) antes e após a quimioterapia. Observaram que a ocorrência de apoptose raramente acontece nas etapas iniciais da doença, porém, após o tratamento quimioterápico, muitas células ativam a morte celular, provavelmente, induzida pela quimioterapia. Não encontraram qualquer alteração no gene *TP53* nas peças da biópsia dos tumores primários. Verificaram que, após o tratamento, os tumores que continham apenas células apoptóticas não apresentavam alterações no gene *TP53*. Para os autores, a mutação do *TP53* pode explicar a ausência de apoptose nos casos em que a terapia não induziu à morte celular. Concluíram que essas mutações são eventos tardios na progressão do

osteossarcoma, raras ao diagnóstico e podem causar desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos durante o curso da doença e, desta maneira, interferir no prognóstico. Os autores consideraram interessante avaliar a presença de apoptose como fator prognóstico, pois o estudo suporta a hipótese de que células de osteossarcoma raramente sofrem apoptose espontânea in vivo. No entanto, após o tratamento, a morte celular programada ocorre, na maioria dos tumores, induzida pela quimioterapia. A mutação do *TP53* pode explicar a ausência de apoptose nos casos em que a terapia não induziu à morte celular.

Rytwinski et al. (2004), por meio de citometria de fluxo, analisaram a relação entre aneuploidia e quantidade de apoptose estimulada por agentes quimioterápicos, portanto após início do tratamento, em vinte crianças e adolescentes portadores de osteossarcoma. Consideraram que estimar a quantidade de células apoptóticas pode ser útil para determinação do prognóstico e do efeito da quimioterapia. Pacientes com maiores índices de apoptose após tratamento apresentaram maior tempo de sobrevida, enquanto que aqueles com menores índices e altas frações de aneuploidia apresentaram menor tempo. No entanto, sugeriram que estes achados precisam ser confirmados por outros marcadores, precoces e tardios de apoptose.

Wu et al. (2004) analisaram, em 28 espécimes de osteossarcoma, a expressão da p53, c-myc, Bcl-2 e índice de apoptose e investigaram a relação entre sobrevida e tipo histológico do tumor. Dos casos analisados, 18 eram de pacientes masculinos e dez eram de pacientes femininos, com idade entre 14 e 37 anos. Do total, 13 tumores eram osteoblásticos, oito fibroblásticos, cinco cartilagosos e dois mistos. Adotaram método imuno-histoquímico para verificar a expressão das proteínas e pelo método do Tunel analisaram a ocorrência de apoptose. O índice de apoptose foi definido em função do número de células apoptóticas presentes em quinhentas células tumorais e classificado conforme o percentual de células encontradas. Foi considerado negativo quando o percentual era menor que 1% e positivo (+)

quando esse percentual estava entre 1% e 5%, positivo (++) quando entre 6% e 10% e positivo (+++) quando maior que 10%. Encontraram positividade para p53, cmyc e bcl-2, em respectivamente, 71,4%, 85,7% e 25% dos espécimes analisados. O índice de apoptose foi positivo em 15 dos 28 espécimes analisados (53,6%), tendo variado entre zero e 17,8%. Não encontraram correlação positiva entre os fatores estudados e o tipo histológico do tumor; porém, menor expressão das proteínas e maior índice de apoptose se associaram à sobrevida maior que três anos. Os autores concluíram que os marcadores analisados podem ser utilizados como índices de prognóstico e de progressão da doença.

Apesar dos poucos estudos publicados a respeito da relação entre apoptose e prognóstico em pacientes com osteossarcoma, estão disponíveis inúmeros trabalhos com este tipo de análise em carcinomas e outros sarcomas.

O índice de apoptose tem sido investigado isoladamente ou em associação com índice de proliferação celular, fatores angiogênicos, expressão de proteínas, sobretudo p53, mdm2 e bcl-2 e mutação gênica. É investigado, também, em diversos momentos da progressão tumoral, desde estádios iniciais até pós-tratamento quimio e radioterápico. Os resultados são, em alguns casos, aparentemente conflitantes já que alguns autores identificaram relação entre índice de apoptose e prognóstico e outros não.

Kasagi et al. (1994), examinaram a ocorrência de células apoptóticas em espécimes de carcinoma gástrico e encontraram, nos carcinomas pobremente diferenciados, reduzida incidência de apoptose.

Ohashi et al. (1997) avaliaram a relação entre expressão da proteína p53 e apoptose em espécimes de carcinoma de células escamosas do esôfago. A apoptose foi associada ao grau de diferenciação das células carcinomatosas.

Tannapfel et al. (1997) encontraram correlação positiva entre apoptose e prognóstico em carcinoma renal.

Hagedorn et al. (1998) analisaram a taxa de proliferação e apoptose em trinta pacientes com carcinoma de laringe, observando associação entre o índice de apoptose e grau de diferenciação tumoral sem, no entanto, relação com o prognóstico.

Haslam et al. (1998) investigaram se o índice de células apoptóticas, ao diagnóstico, tem valor preditivo quanto à evolução clínica. Estudaram 43 crianças portadoras de meduloblastoma e agruparam o índice de apoptose em quatro níveis: muito baixo, baixo, alto e muito alto. Para os pacientes com índice de apoptose caracterizado como muito alto, foi encontrada associação com melhor evolução clínica.

Sugamura et al. (1998) afirmaram que a frequência da apoptose em células tumorais pode ser utilizada como indicador de prognóstico para pacientes portadores de carcinoma colorretal.

Para Lara et al. (1999), o índice apoptótico pré-tratamento é fator preditivo de prognóstico em pacientes com diagnóstico de câncer de bexiga tratados por meio de radioterapia.

Em meduloblastomas, o índice de apoptose maior ou igual a 1,5% está associado a mau prognóstico, conforme Korshunov et al. (1999).

Vakkala et al. (1999), verificaram a ocorrência de apoptose durante a progressão de carcinoma de mama e identificaram aumento da ocorrência de apoptose e de proliferação celular nos tumores recorrentes quando comparados ao tumor primário. Concluíram que o aumento da ocorrência de apoptose está associado a pior prognóstico.

Shibakita et al. (2000) delinearam estudo para avaliar a importância clínica da apoptose espontânea e possível associação com as características clínicas dos pacientes portadores de carcinoma de esôfago. Os pacientes com baixo índice de apoptose apresentaram pior prognóstico, em relação àqueles com alto índice. Tal conclusão foi semelhante à de Shibata & Matsubara (2001) que examinaram apoptose em 72 amostras de carcinoma de esôfago e

concluíram que o índice de apoptose pode ser usado como fator prognóstico nesse tipo de carcinoma.

Para Shibata & Matsubara (2001), cada tumor apresenta intervalos de índices de apoptose característicos, que refletiriam a inata susceptibilidade apoptótica das células tumorais. Citam, como exemplo, o intervalo de índice de apoptose entre 0,4 e 1,8 para carcinoma de tireóide, de 0,1 a 1,7 para carcinoma de próstata, de 2,7 a 14,5 para carcinoma gástrico, de 1,9 a 9,7 para carcinoma colorretal e de 0,8 a 9,4 para carcinoma de células escamosas do esôfago.

Zaghloul et al. (2000) analisaram a relação entre prognóstico e índice de apoptose e angiogênese em pacientes portadoras de câncer de útero. As pacientes com alto índice de apoptose e baixa angiogênese apresentaram maior probabilidade de sobrevida em três anos.

Kawauchi et al. (2000) realizaram o primeiro estudo que analisou a significância da apoptose no sarcoma sinovial com resultados que indicaram que o aumento da taxa de apoptose no sarcoma sinovial primário é indicativo de pior prognóstico.

Grotzer et al. (2001) avaliaram o papel da apoptose como fator prognóstico independente em tumor ectodérmico primitivo (PNET). Concluíram que o índice apoptótico não é preditivo do curso clínico nem é especificamente associado às variáveis clínicas de significância prognóstica no PNET.

Dan'ura et al. (2002) consideraram que os achados de ocorrência e extensão da apoptose nos tumores de partes moles têm implicação clínica limitada. Avaliaram 102 casos de sarcoma de partes moles e não encontraram relação entre extensão da apoptose e expressão das proteínas reguladoras e prognóstico.

Jia et al. (2004) investigaram ocorrência de apoptose em carcinoma cístico de glândulas salivares e identificaram associação entre índice de apoptose e prognóstico.



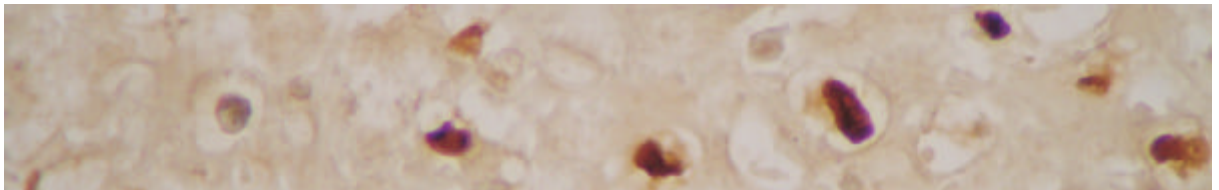
Para Sagol et al. (2005), a atividade apoptótica não é indicadora da extensão da doença e do curso clínico dos pacientes portadores de câncer pancreático. Já Magistrelli et al. (2006) associaram índice de apoptose à sobrevida em 67 pacientes portadores de adenocarcinoma pancreático tratados com ressecção cirúrgica. A média de sobrevida nos pacientes com baixo índice apoptótico foi melhor que naqueles com alto índice.

Dworakowska et al. (2005) encontraram probabilidade de sobrevida de 60%, em cinco anos, para os pacientes portadores de câncer de pulmão que apresentavam baixo índice de apoptose e de apenas 25% para aqueles com alto índice.

Para Blazquez et al. (2006) o índice apoptótico, o índice proliferativo e a expressão de caspases não são fatores prognósticos independentes para recorrência e mortalidade nos pacientes portadores de câncer ductal de mama.

Talvez a raridade da doença justifique os poucos trabalhos referidos na literatura, que analisam a relação entre apoptose e prognóstico em pacientes portadores de osteossarcoma, todos com pequena quantidade de casos. De maneira similar à que ocorre com estudos envolvendo o gene *TP53* e a proteína p53, as diferentes metodologias empregadas, a variação do número de pacientes, ou ainda o momento da análise durante a progressão tumoral, provavelmente, podem ser fatores que dificultam o esclarecimento definitivo sobre a importância da ocorrência de apoptose como fator preditivo de prognóstico.

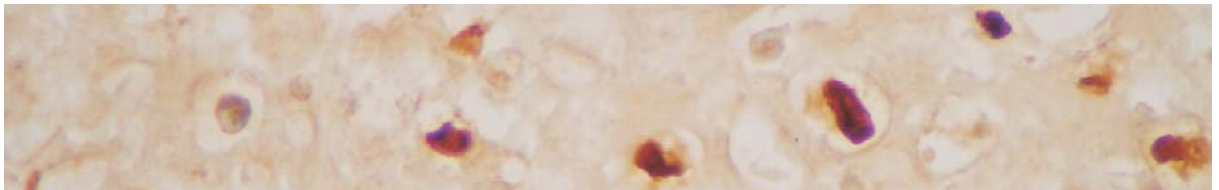
# Objetivo



### 3 OBJETIVO

Investigar, em osteossarcoma, a possível associação entre fatores clínicos, epidemiológicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos com o prognóstico.

# Casuística e método



#### 4 CASUÍSTICA E MÉTODO

A casuística estudada foi constituída por 69 pacientes com diagnóstico confirmado de osteossarcoma ósseo, primário e secundário, tratados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp (Botucatu - SP) e no Hospital Amaral Carvalho (Jaú - SP), no período de 1990 a 2004. A confirmação diagnóstica histopatológica foi realizada pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Amaral Carvalho.

Os pacientes foram submetidos a diferentes protocolos de tratamento e, na maioria das peças de ressecção tumoral, procedeu-se à quantificação do efeito quimioterápico neo-adjuvante de acordo com os critérios preconizados por Huvos (1991).

Foram coletados dados epidemiológicos, clínicos, histológicos e do tratamento para conhecimento da amostra. As variáveis consideradas foram: idade, sexo, localização do tumor, classificação e subtipos tumorais, protocolo do tratamento quimioterápico instituído, cirurgia do tumor primário, complicações do tratamento, resposta histológica à quimioterapia pré-operatória, evolução (vivo ou morto) e tempo de sobrevida.

Os dados foram obtidos nos prontuários hospitalares e completados, quando necessário, com informações dos familiares dos pacientes.

Após a coleta dos dados, as variáveis foram agrupadas e analisadas em relação à distribuição, frequência e possível associação com o tempo de sobrevida. Para análise da relação com o tempo de sobrevida, as variáveis foram agrupadas conforme apresentado no quadro 1.

Para análise estatística da sobrevida, além da amostra tomada por inteiro, foi analisado subgrupo constituído somente por pacientes portadores de osteossarcoma de alto grau, de extremidades, virgens de tratamento, estágio IIB e que realizaram o tratamento completo. Esse grupo, mais

homogêneo, de 45 pacientes, foi semelhante à maioria dos grupos descritos nos trabalhos publicados sobre osteossarcoma.

**Quadro 1** – Agrupamento das variáveis para análise estatística

idade	< 19	≥ 19			
sexo	masculino	feminino			
localização tumor	fêmur	tíbia	outros		
predominância histológica	não osteogênica	osteogênica			
estadiamento	I	II	III		
adesão ao tratamento	completa	incompleta			
tratamento quimioterápico	não realizado	I	II	III	IV
cirurgia tumor primário	não realizada	amputação	conservadora		
complicações do tratamento	sim	não			
grau de necrose	não realizado	I/II	III/IV		
evolução	morto	vivo			

Simultaneamente, nas amostras da biópsia óssea realizada para confirmação histológica do diagnóstico, portanto, pré-tratamento, foi

verificada, pelo método imuno-histoquímico, a ocorrência de apoptose e expressão da proteína p53 e a possível associação com o tempo de sobrevida.

#### 4.1 Padronização e definições utilizadas na coleta dos dados:

- a) *início do seguimento*: data do diagnóstico histopatológico;
- b) *idade*: diferença entre a data do diagnóstico histológico e a data de nascimento em anos completos;
- c) *faixa etária*: agrupamento da idade em intervalos de dez anos;
- d) *sexo*: conforme informado na ficha de admissão do paciente;
- e) *localização do tumor*: osso acometido;
- f) *extensão local da doença e pesquisa de metástases à distância*: os procedimentos mínimos utilizados para definir a extensão do tumor primário e metástases incluíram radiografia biplanar convencional, cintilografia óssea com MDP-99mTc (metilenodifosfonado marcado com tecnécio) e ultra-som abdominal. A utilização de outros métodos como tomografia computadorizada e ressonância magnética variou conforme a época do diagnóstico e disponibilidade. O tamanho do tumor não foi avaliado, pois não se evidenciou uniformização de aferição da dimensão do tumor antes do início do tratamento;
- g) *características histopatológicas do tumor*: determinadas conforme descrição histológica do material de biópsia e da peça de ressecção cirúrgica ou da revisão de lâminas. Os tumores foram caracterizados conforme o grau histológico em alto e baixo grau e de acordo com a predominância tecidual encontrada;
- h) *estadiamento inicial*: de acordo com o proposto por Enneking (1983) (quadro 2);

**Quadro 2** – Estadiamento dos sarcomas ósseos e de tecidos moles, segundo Enneking (1983)

ESTÁDIO	DEFINIÇÃO
IA	baixo grau, intracompartimental, sem metástases
IB	baixo grau, extracompartimental, sem metástases
IIA	alto grau, intracompartimental, sem metástases
IIB	alto grau, extracompartimental, sem metástases
IIIA	baixo /alto grau, intracompartimental com metástases regionais ou distantes
IIIB	baixo /alto grau, extracompartimental com metástases regionais ou distantes

*i) tratamento quimioterápico efetuado:* identificado mediante protocolo estabelecido para o tratamento. Os protocolos variaram de acordo com a época do início de tratamento. Foram aplicados quatro protocolos diferentes, baseados em Petrilli (1988, 1991, 2005) (quadro 3);



Quadro 3 – Protocolos de tratamento quimioterápico

PROTOCOLO	DROGAS UTILIZADAS E MOMENTO DA CIRURGIA
I	cisplatina, doxorubicina; <b>cirurgia;</b> cisplatina, doxorubicina.
II	metotrexate, cisplatina, doxorubicina; <b>cirurgia;</b> manutenção do pré-operatório ou substituição do metotrexate por ifofasmida para maus respondedores.
III	ciclo A = ifosfamida, doxorubicina; ciclo B = cisplatina, doxorubicina; ciclo C = ifosfamida, etoposide; ciclo D = cisplatina, etoposide; esquema de tratamento = A/B/A/B <b>cirurgia</b> C/D/C/D.
IV	cisplatina, doxorubicina, metotrexate; <b>cirurgia;</b> cisplatina, doxorubicina, metotrexate; manutenção metronômica com metotrexate e ciclofosfamida.

*j) data da cirurgia e cirurgia realizada:* obtida na ficha de descrição cirúrgica. Para análise da sobrevida e elaboração das tabelas e quadros, as cirurgias de amputação e de desarticulação foram consideradas conjuntamente e denominadas como amputação;

*l) grau de necrose tumoral após o tratamento quimioterápico neoadjuvante:* determinado conforme laudo anatomopatológico da peça de ressecção cirúrgica e definido segundo critérios propostos por Huvos (1991) (quadro 4);

**Quadro 4** - Grau de necrose tumoral histológica após tratamento quimioterápico neo-adjuvante, segundo Huvos (1991)

grau I	pequeno ou nenhum efeito quimioterápico. Até 50% de necrose tumoral
grau II	resposta parcial. Tumor viável presente. De 50% a 90% de necrose tumoral
grau III	áreas predominantes de necrose e ou material fibrótico atribuído ao efeito da quimioterapia. De 90% a 99% de necrose tumoral
grau IV	sem evidência histológica de tumor viável. Cem por cento de necrose tumoral

*m) recidiva local:* tumor em crescimento no leito de ressecção prévia ou em áreas adjacentes, documentado clinicamente e por intermédio do estudo anatomopatológico e dos exames de imagens;

*n) intercorrências:* eventos clínicos adversos ocorridos durante o tratamento;

*o) evolução clínica:* recuperada na ficha clínica de evolução do paciente;

*p) data do óbito:* recuperada no prontuário, atestado de óbito ou informada por familiares;

*q) tempo de sobrevida:* tempo decorrido entre a data do diagnóstico histológico até o óbito e para os pacientes vivos, encerramento da observação.

## 4.2 Estudo imuno-histoquímico

Foi analisado o tecido tumoral recolhido para biópsia diagnóstica antes do início de qualquer tratamento. Os fragmentos tumorais fixados em

formalina e incluídos em blocos de parafina, foram resgatados dos arquivos da Anatomia Patológica dos serviços onde o diagnóstico histológico inicial foi realizado.

No caso de pacientes que se apresentaram na primeira consulta com a biópsia realizada em outros serviços, os blocos foram solicitados. Não foi possível obter todos os blocos. Alguns blocos continham pouco material, insuficiente para a confecção de mais secções histológicas. Esses fatores determinaram redução da amostra de 69 para 53 casos para análise da expressão da proteína p53 e para determinação do índice de apoptose.

Foram preparadas secções histológicas suficientes, para permitir a confirmação diagnóstica pela coloração hematoxilina e eosina e para análise imuno-histoquímica, conforme técnica descrita a seguir, de acordo com métodos estabelecidos pelo Laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp.

#### *4.2.1 Procedimentos gerais*

Cortes histológicos de 3µm de espessura, retirados das biópsias ósseas, foram colocados sobre lâminas histológicas identificadas e pré-tratadas com solução de poly-D-lisina<sup>1</sup> e aquecidas em estufa à 60°C por doze horas.

Em seguida, foram submetidas a desparafinização, obtida após três banhos de xilol de dez minutos cada. A hidratação foi obtida pela passagem do material por três banhos sucessivos em álcool absoluto e água destilada. Para bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%, durante cinco minutos. Para a recuperação antigênica, as secções foram colocadas em cuba com tampão citrato (pH=6) e levadas ao forno de

---

<sup>1</sup> Sigma Chemical, EUA.

microondas, por quinze minutos, permanecendo no forno por mais vinte minutos, à temperatura ambiente.

#### 4.2.2 Reação imuno-histoquímica para p53

Para a determinação da expressão da proteína p53, foi empregado o sistema avidina-biotina-peroxidase (ABC), com pequenas modificações. O processo específico compreendeu as seguintes etapas:

- a) *incubação com anticorpo primário*: foram aplicados 100µl a 200µl de anticorpo primário monoclonal anti-p53 de camundongo (1:100)<sup>1</sup>. A bandeja de imuno-histoquímica<sup>2</sup> foi fechada e deixada incubando em câmara úmida, na geladeira, a 4°C, durante toda a noite;
- b) *incubação com anticorpo secundário*: foi aplicado, em cada corte histológico, 100µl a 200µl do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo<sup>3</sup> e incubado por trinta minutos;
- c) *reagente estreptavidina*<sup>4</sup>: adicionou-se 100µl do reagente e em seguida, as lâminas foram submetidas à incubação por trinta minutos;
- d) *incubação com solução de 3'3'-diaminobenzidina tetrahydrocloroto (DAB)*<sup>5</sup>: foram aplicadas 100µl a 200µl/lâmina, da solução DAB ativada, em cada lâmina, por cinco minutos;
- e) *contra-coloração com hematoxilina de Harris a 50%*: após um minuto da aplicação da hematoxilina, procedeu-se à lavagem em água corrente,

---

<sup>1</sup> DAKO, EUA.

<sup>2</sup> Shandon, EUA.

<sup>3</sup> DAKO, EUA.

<sup>4</sup> DAKO, EUA.

<sup>5</sup> DAKO, EUA.

seguida pela passagem das lâminas em água amoniacal e novamente em água corrente;

f) *montagem das lâminas*: colocação de lamínula (24x32mm) sobre a lâmina, com resina sintética.

Os resultados foram avaliados em microscópio óptico<sup>1</sup> utilizando-se ocular de 10X e objetiva de 40X. A reação foi considerada positiva quando houve deposição do cromógeno nos sítios de ligação antígeno-anticorpo, conferindo marcação nuclear, resultando em núcleos com forte coloração marrom escura. Foi considerada negativa, quando, não havendo a deposição do cromógeno, os núcleos apresentaram coloração marrom claro ou não foram corados.

#### ***4.2.3 Determinação da apoptose pelo método de Tunel***

Após os procedimentos iniciais, comuns a ambas as reações, foram realizados os procedimentos específicos<sup>2</sup> para identificação das células apoptóticas no material estudado, conforme descrito a seguir:

- a) *permeabilização dos cortes histológicos*: aplicação, nas secções, de 100µl de proteinase K (1:100), durante vinte minutos, à temperatura ambiente;
- b) *estabilização para a reação de marcação*: diluição do tampão de equilíbrio, em água destilada, na proporção 1:5. Cada lâmina recebeu 100µl dessa diluição, durante trinta minutos à temperatura ambiente;
- c) *reação de marcação*: adicionado 3µl da enzima TdT à 57µl da mistura da reação de marcação. Cada lâmina recebeu 60µl dessa diluição e foi mantida em estufa à temperatura de 37°C durante uma hora e meia;

---

<sup>1</sup> Nikon modelo Eclipse.

<sup>2</sup> kit Tdt FragEL – CALBIOCHEM – USA

- d) *finalização da reação de marcação*: Após aquecimento da “solução de parada” em estufa à temperatura de 37°C, cada lâmina recebeu 100µl de “tampão de parada de reação”, durante cinco minutos, à temperatura ambiente;
- e) *suspensão da reação*: cada lâmina permaneceu mergulhada em 100µl de “tampão de bloqueio” durante dez minutos à temperatura ambiente e em seguida, mais trinta minutos mergulhadas em 100µl da solução formada pelo conjugado diluído em “tampão de bloqueio”, na proporção 1:50. Após essa etapa, um tablete de DAB e um tablete de água oxigenada/uréia foram dissolvidos em 1ml de água e cada lâmina recebeu 100 µl dessa diluição, durante dez minutos também à temperatura ambiente;
- f) *contra-coloração*: as lâminas foram colocadas em uma cuba com methyl green, permanecendo por um minuto; posteriormente foi realizada a lavagem em água corrente, seguida pela passagem das lâminas em água amoniacal e, novamente, pela lavagem em água corrente;
- g) *montagem das lâminas*: com lamínula (24 × 32mm) em resina sintética.

Uma lâmina (com material citológico) de controle positivo de apoptose, fornecida pelo fabricante, foi incluída nas reações (células HL60 de leucemia promielocítica tratadas com 0,5 g/ml de actinomicina D).

#### **4.2.4 Cálculo do índice de apoptose**

A identificação das células em apoptose, pelo método de Túnel (*terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated d UTP nick end-labeling*), deu-se pela visualização de núcleos com marcação positiva, corados em marrom.

A leitura dos campos foi realizada em microscópio<sup>1</sup> utilizando-se ocular de 10X e objetiva de 40X. A escolha dos campos para contagem foi direcionada aos de maior celularidade, boa preservação das células tumorais e onde a coloração era mais uniforme.

Para o cálculo dos índices de apoptose, foram contadas duzentas células, em campos sucessivos. O índice foi definido como número de células positivas, dividido por duzentos (número total de células contadas nos campos analisados) e multiplicado por cem, quando expresso em porcentagem.

Para análise estatística, os resultados foram agrupados, conforme o disposto no quadro 5.

**Quadro 5** – Resultados das análises imuno-histoquímicas

<b>p53</b>	não realizado	negativo	positivo		
<b>índice de apoptose</b>	não realizado	menor que 1% (negativo)	1% a 5%	6% a 10%	maior que 10%

### 4.3 Análise estatística

As fichas preenchidas foram revisadas, as informações codificadas e digitadas em banco de dados do programa SigmaStat for Windows versão 3.5, 2006<sup>2</sup>.

As diferenças ou correlações com valor de  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

<sup>1</sup> Nikon modelo Eclipse.

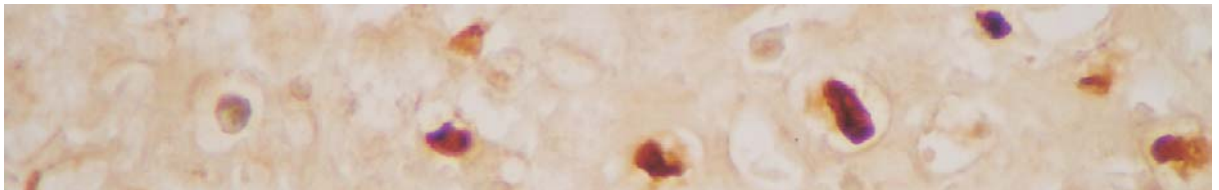
<sup>2</sup> Systat Software Inc (Point Richmond, CA, USA).

A análise univariada da sobrevida foi realizada com construção de curvas de sobrevivência de Kaplan–Meier (Kaplan & Meier, 1958), método não paramétrico que permite a comparação entre diferentes categorias de uma variável durante o período de sobrevida. Os resultados dos testes de *log-rank* e Gehan–Breslow permitiram avaliar, estatisticamente, a heterogeneidade das curvas.

A verificação da provável associação entre procedimento cirúrgico e grau de necrose e entre grau de necrose e recidiva foi realizado pelo Teste de Goodman (Goodman, 1964,1965).



# Resultado



## 5 RESULTADO

### 5.1 Tempo de seguimento

A média do período de observação foi de  $46,2 \pm 41,6$  meses (três a 183 meses).

### 5.2 Idade

A média de idade foi de  $19 \pm 8,1$  anos (seis a 43 anos). A distribuição dos pacientes de acordo com a faixa etária está demonstrada na figura 1.

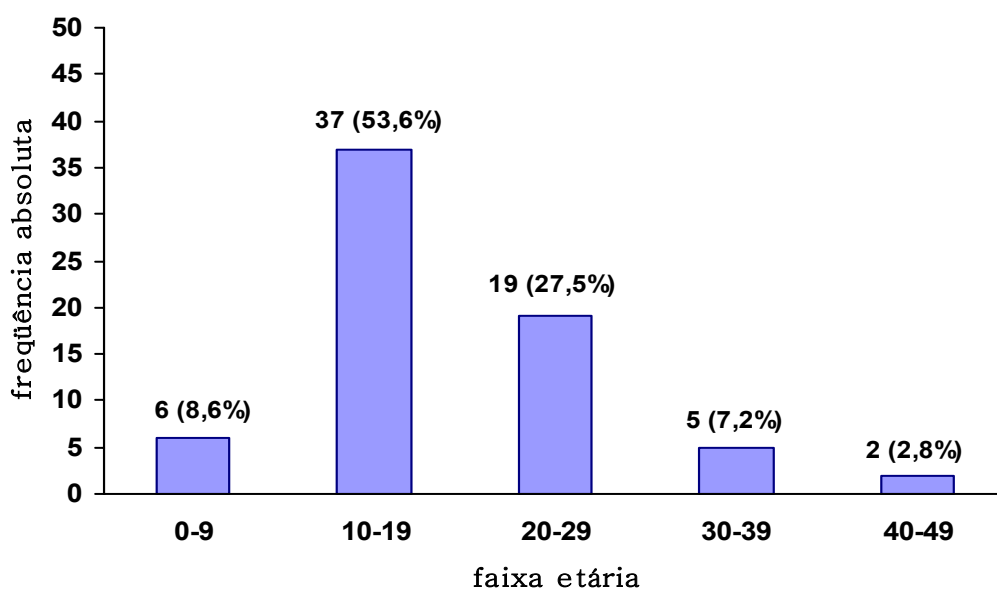


Figura 1 - Distribuição dos pacientes de acordo com a faixa etária

### 5.3 Sexo

Na figura 2 está expressa a distribuição dos pacientes de acordo com o sexo.

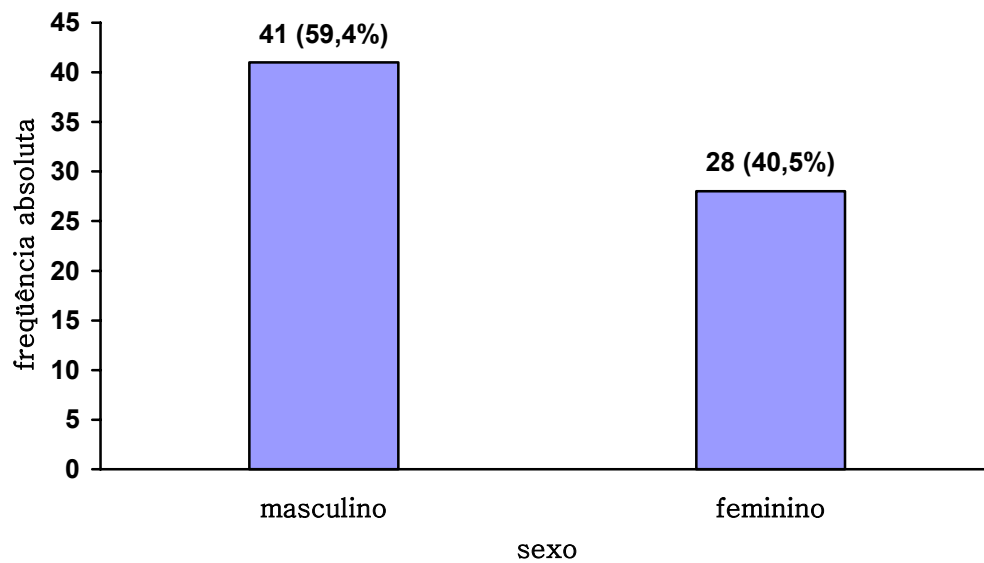


Figura 2 – Distribuição dos pacientes de acordo com o sexo

#### 5.4 Localização do tumor

Na figura 3 estão apresentadas as localizações dos tumores estudados.

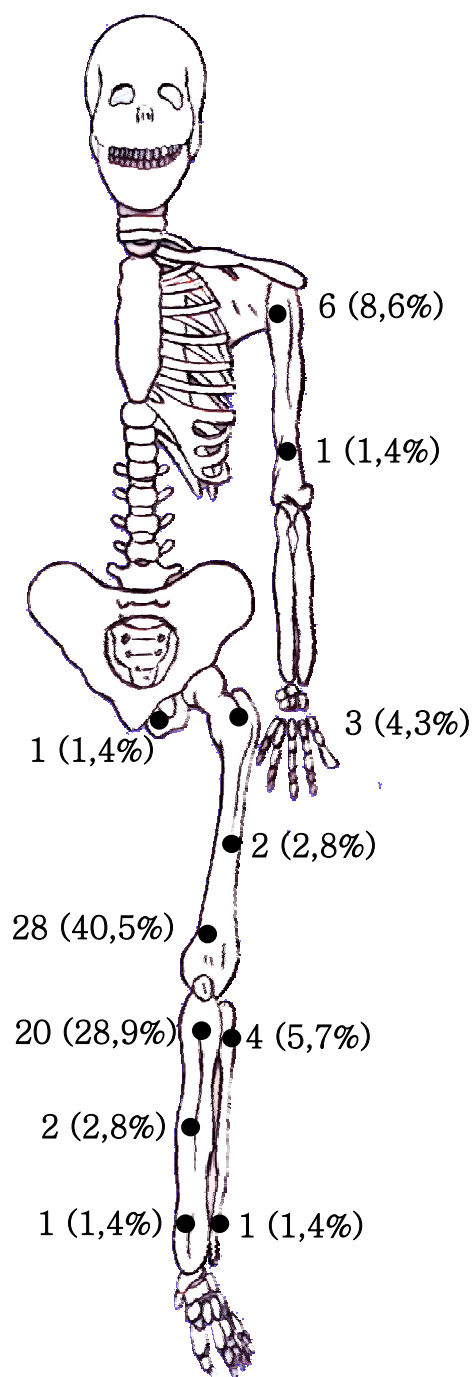


Figura 3 – Localização e número de casos dos tumores

### 5.5 Classificação do tumor

Os osteossarcomas centrais foram os mais comuns, presentes em 65 pacientes (94,2%). Quatro pacientes apresentaram tumores periféricos. Dois (2,8%) desenvolveram osteossarcomas secundários. Nas figuras 4 e 5 estão apresentadas as distribuições dos tumores de acordo com classificação.

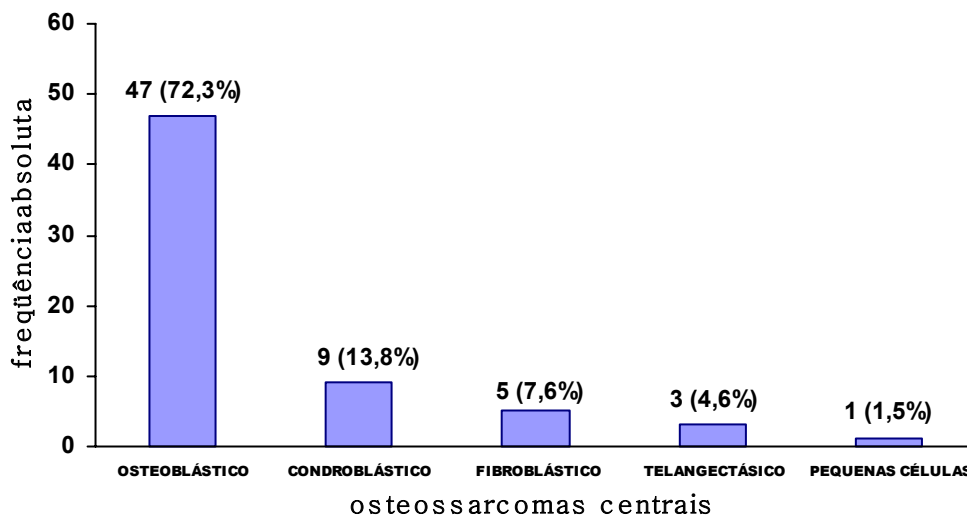


Figura 4 - Distribuição dos osteossarcomas centrais de acordo com classificação histológica

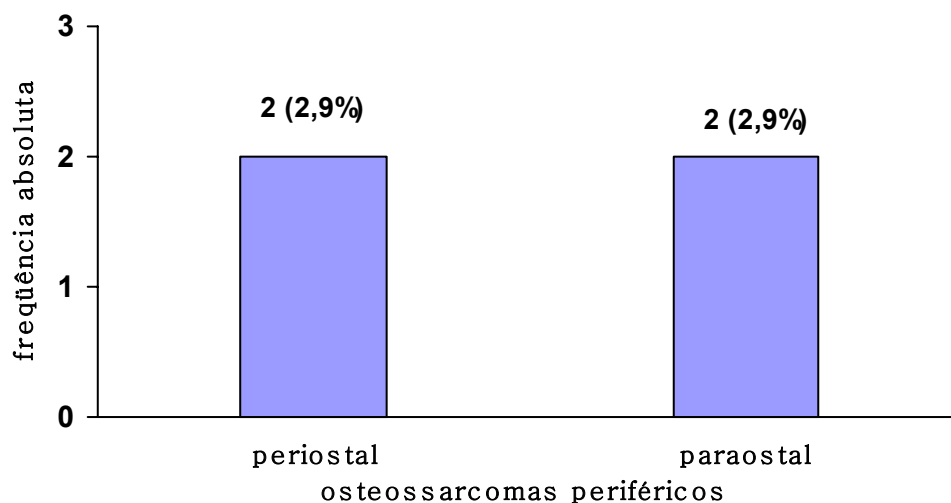


Figura 5 - Distribuição de osteossarcomas periféricos de acordo com classificação

## 5.6 Estadiamento

A distribuição dos pacientes de acordo com estadiamento inicial está apresentada na figura 6. Dos sessenta pacientes com tumores estágio II, 58 (96,66%) foram extracompartmentais.

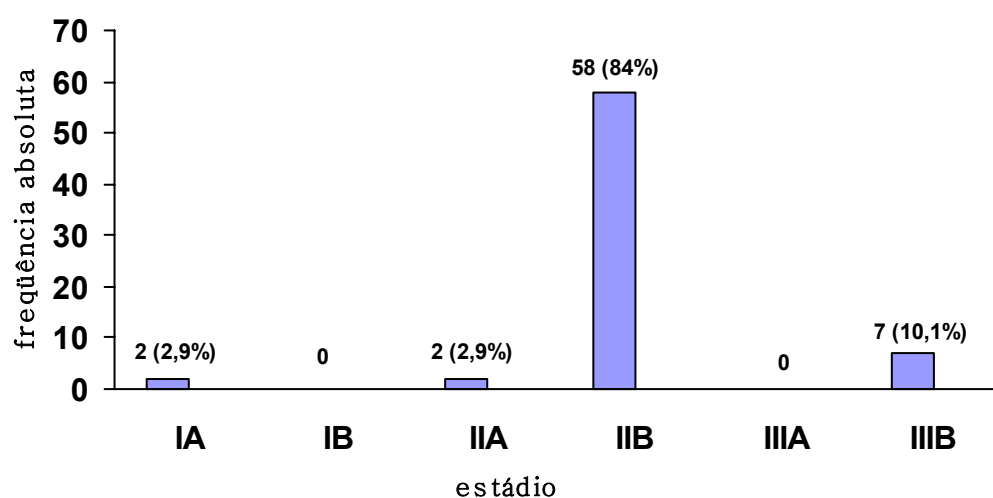


Figura 6 – Distribuição dos pacientes de acordo com estadiamento

## 5.7 Adesão ao tratamento

Quatorze pacientes não completaram o tratamento indicado. Seis não foram submetidos à cirurgia: cinco por recusa e um por óbito no período pré-operatório. Oito pacientes não completaram o tratamento quimioterápico após a cirurgia: sete, por óbito antes do término do tratamento e um, por abandono após cirurgia de amputação. Assim, seis (8,6%) foram os que efetivamente abandonaram o tratamento, com média de sobrevida após o diagnóstico, de nove  $\pm$ 3,6 meses (três a 14 meses).

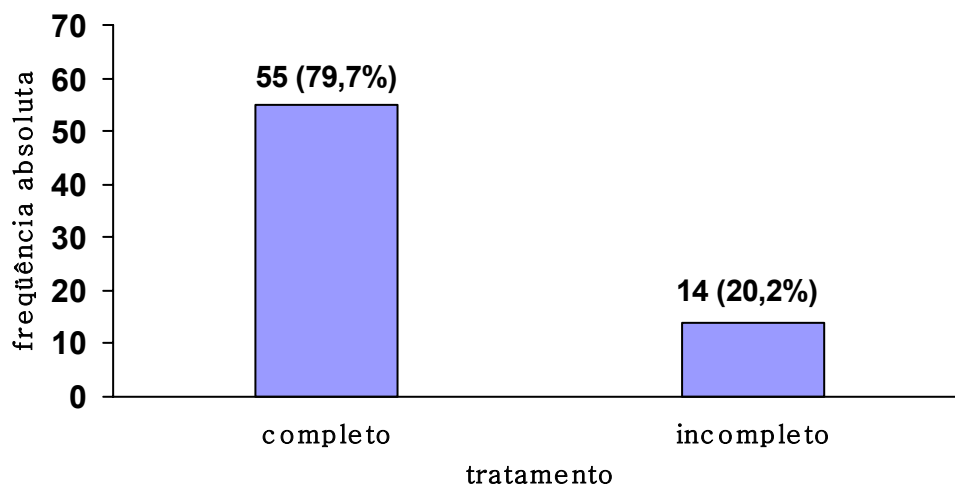


Figura 7 – Distribuição dos pacientes de acordo com adesão ao tratamento

### 5.8 Protocolo de tratamento quimioterápico

A figura 8 representa a distribuição dos pacientes de acordo com o protocolo de tratamento efetuado. Dois pacientes, com tumores bem diferenciados, não foram submetidos a tratamento quimioterápico.

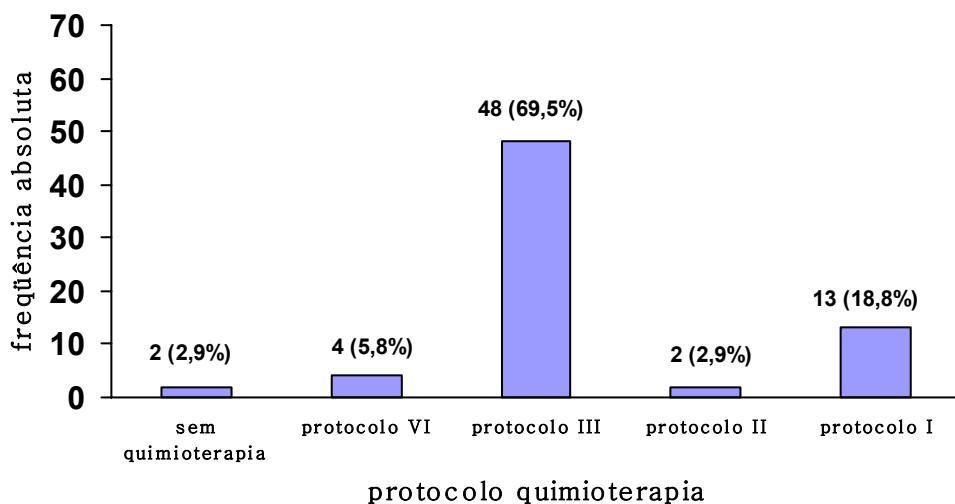
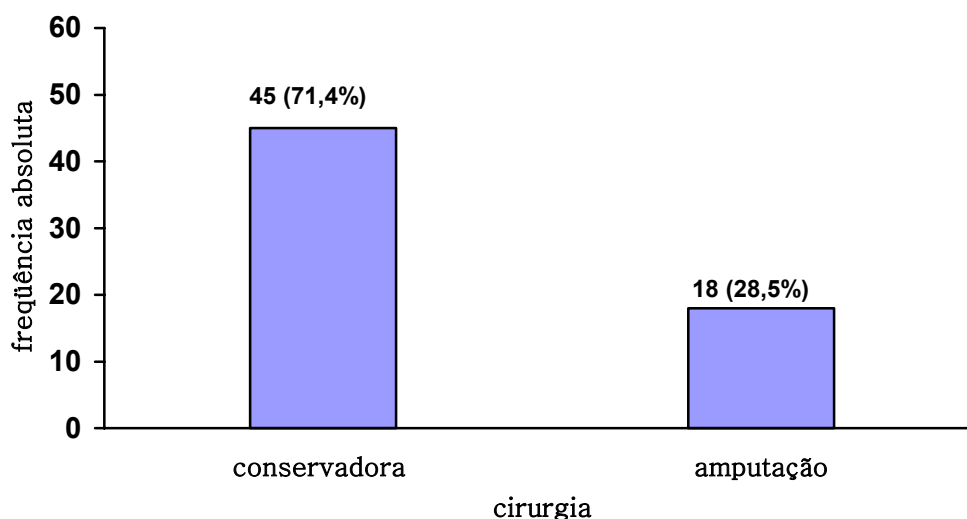


Figura 8 – Distribuição dos pacientes de acordo com protocolo de quimioterapia

### 5.9 Cirurgia do tumor primário

A figura 9 expressa a distribuição dos pacientes de acordo com cirurgia do tumor primário



**Figura 9** - Distribuição dos pacientes de acordo com cirurgia do tumor primário

A média de sobrevida dos pacientes submetidos à cirurgia conservadora foi de  $58,6 \pm 45,6$  meses (5-183 meses). Os pacientes submetidos à cirurgia de amputação apresentaram média de sobrevida de  $27,6 \pm 18,5$  meses (7-65 meses).

A relação entre cirurgia do tumor primário e resposta histológica ao tratamento está demonstrada na figura 10 e a tabela 1 expressa o resultado do teste de Goodman aplicado a essa relação.



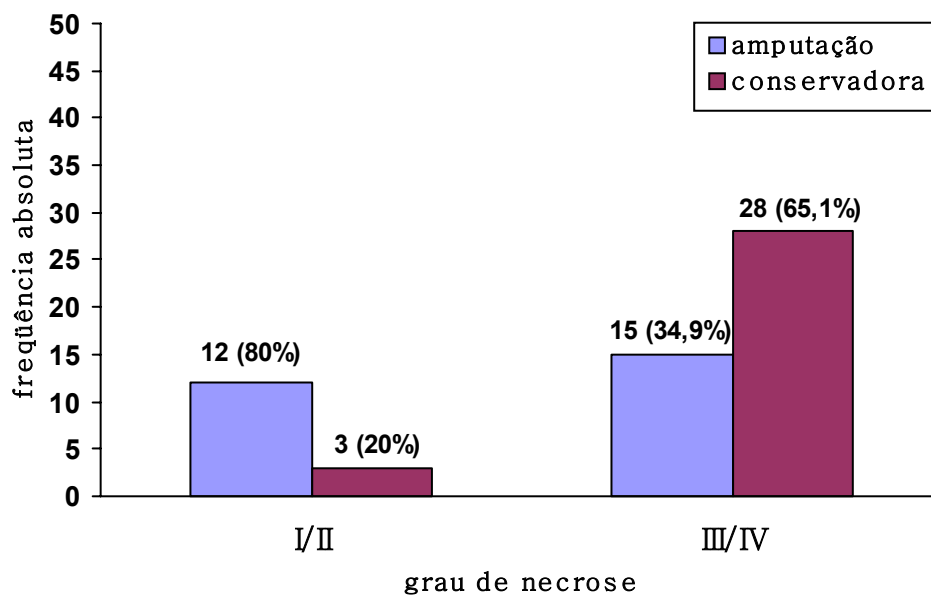


Figura 10 – Grau de necrose e cirurgia do tumor primário

Tabela 1 – Grau de necrose e cirurgia do tumor primário analisado mediante teste de Goodman

Procedimento cirúrgico	grau de necrose		resultado teste de grau de necrose
	I / II	III / IV	
amputação	12 (80%)	3 (20%)	$p < 0,01$
conservadora	15 (34,9%)	28 (65,1%)	$p < 0,05$
resultado do teste de procedimento cirúrgico	$p < 0,01$	$p < 0,01$	

## 5.10 Complicações do tratamento

Na figura 11 estão representadas as complicações advindas do tratamento efetuado.

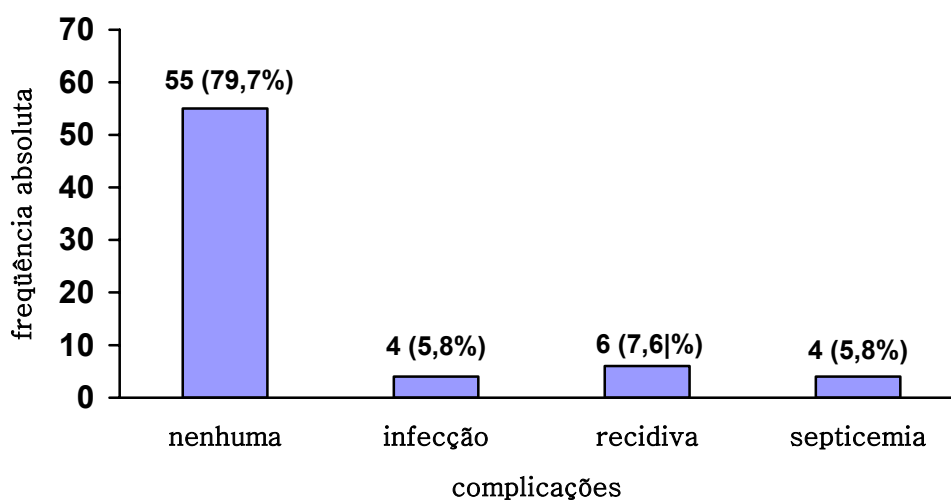


Figura 11- Complicações do tratamento

Entre os 63 pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico, seis apresentaram recidiva local (9,5%) e quatro, infecção no sítio cirúrgico (6,3%). Dos quatro casos de infecção, três ocorreram após colocação de endoprótese e um após cirurgia de ressecção e substituição. Na figura 12 estão quantificadas as complicações ocorridas em decorrência do tratamento cirúrgico efetuado.

Cinco dos casos de recidiva local ocorreram após colocação de endoprótese, totalizando 11,1% do total de cirurgias conservadoras e 12,8% do total de cirurgias para colocação de enduro. Apenas um caso (5,5%), de recidiva ocorreu após amputação. Todos evoluíram para óbito, com média de sobrevida de  $21,3 \pm 13,5$  meses (10-47).

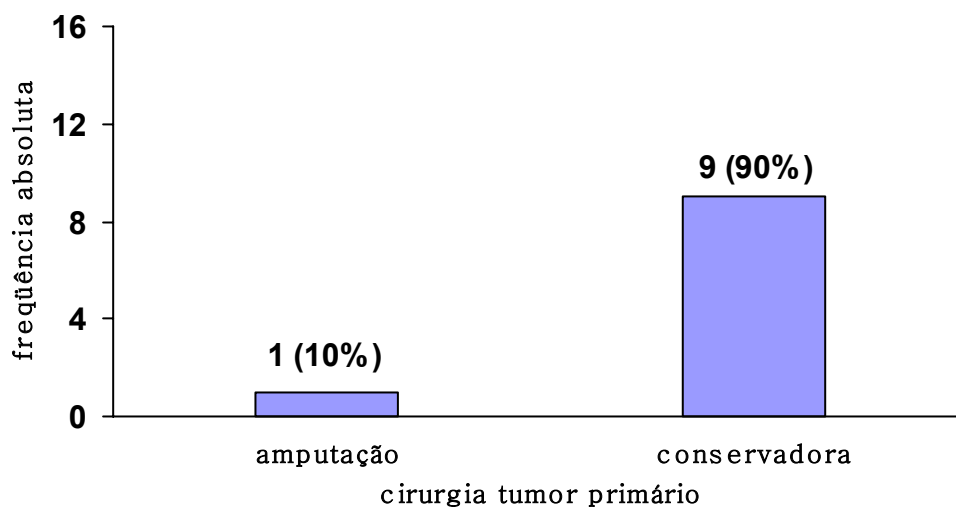


Figura 12 – Incidência de complicações de acordo com tipo de cirurgia

Dos seis pacientes com recidiva local, cinco apresentaram, na peça cirúrgica, grau de necrose I/II e um grau III (Figura 13). A tabela 2 expressa o resultado do teste de Goodman aplicado à relação entre grau de necrose e recidiva local.

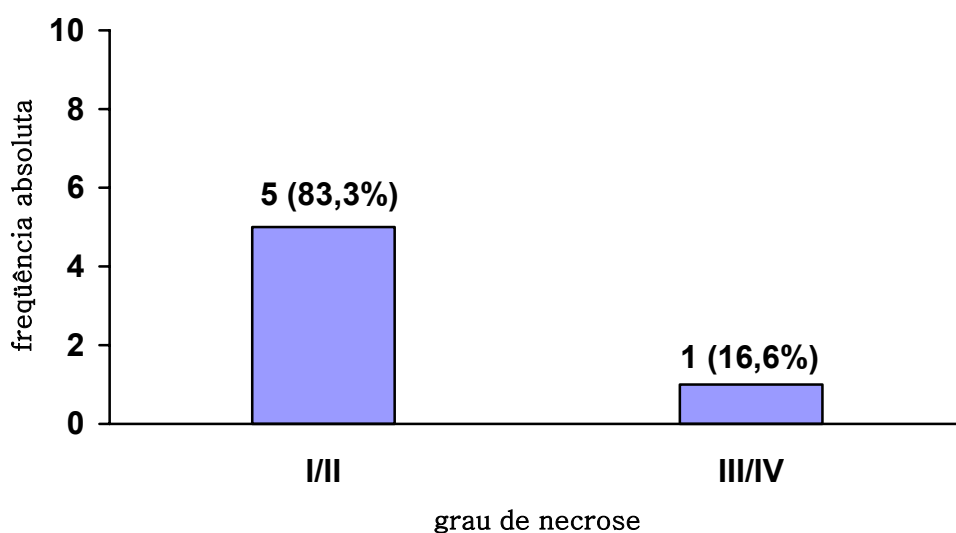


Figura 13 – Grau de necrose e recidiva local

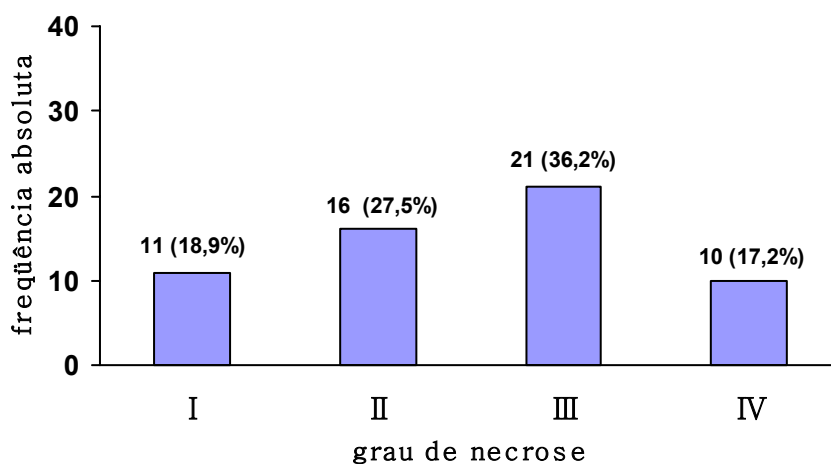
**Tabela 2** - Grau de necrose e recidiva local analisado mediante teste de Goodman.

	grau de necrose	
	I / II	III / IV
recidiva	5 (18,5%)	1 (3,3%)
não recidiva	22 (81,4%)	30 (96,6%)
p = 0,057		

Dos quatro casos que apresentaram infecção, todos foram amputados, dois continuavam vivos e dois faleceram, um após 20 e outro após 35 meses do diagnóstico.

### 5.11 Resposta histológica à quimioterapia pré-operatória

A verificação da resposta histológica à quimioterapia pré-operatória foi realizada em 58 pacientes (84,0%) e os resultados apresentados na figura 14.



**Figura 14** - Distribuição dos pacientes de acordo com grau de necrose

### 5.12 Evolução clínica

A figura 15 expressa a evolução dos pacientes ao final do estudo.

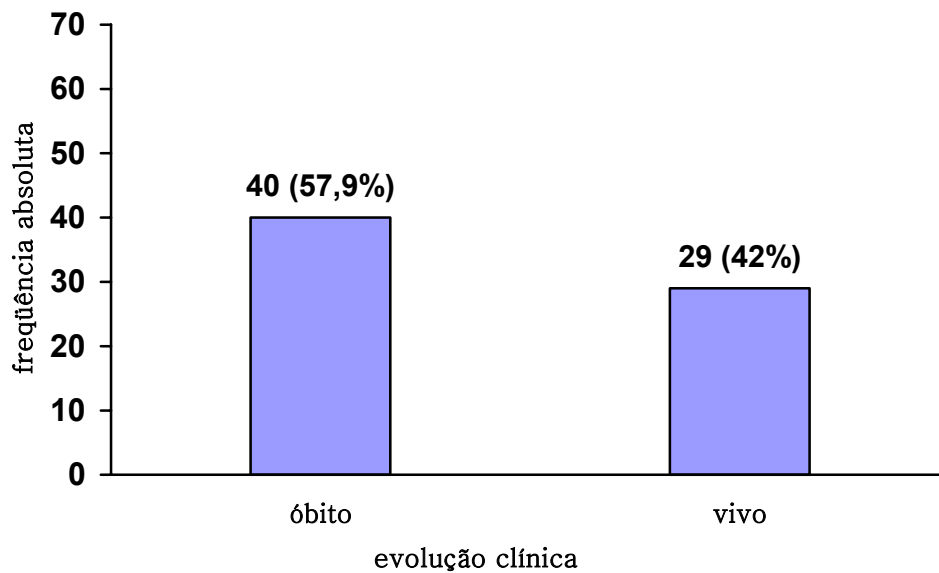


Figura 15 – Distribuição dos pacientes de acordo com evolução clínica

### 5.13 Expressão da proteína p53

A identificação da expressão da proteína p53 e o índice de apoptose foram realizados em 53 casos. O resultado do teste imunohistoquímico para proteína p53 está demonstrado na figura 16.

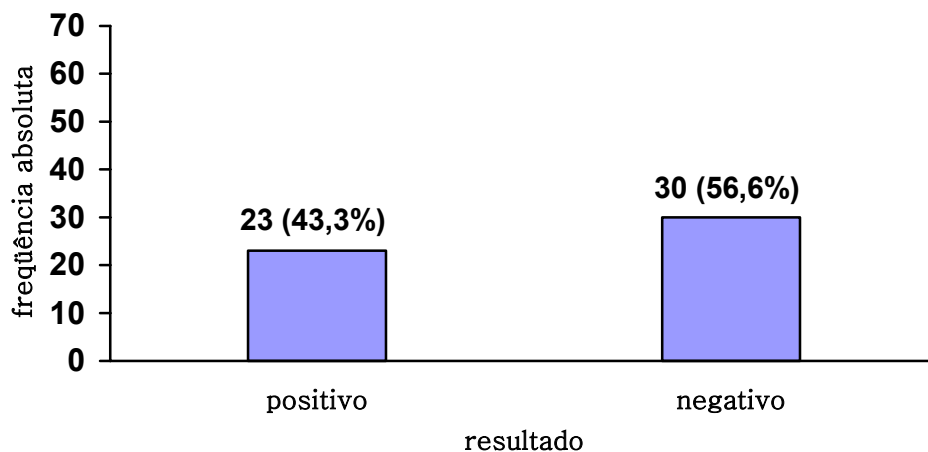


Figura 16 – Resultado do teste imunohistoquímico para proteína p53

### 5.14 Índice de apoptose

A média do índice de apoptose foi de 13,4%  $\pm$ 11,2% variando de zero até 36%. Na figura 17 estão apresentados os valores agrupados desse índice

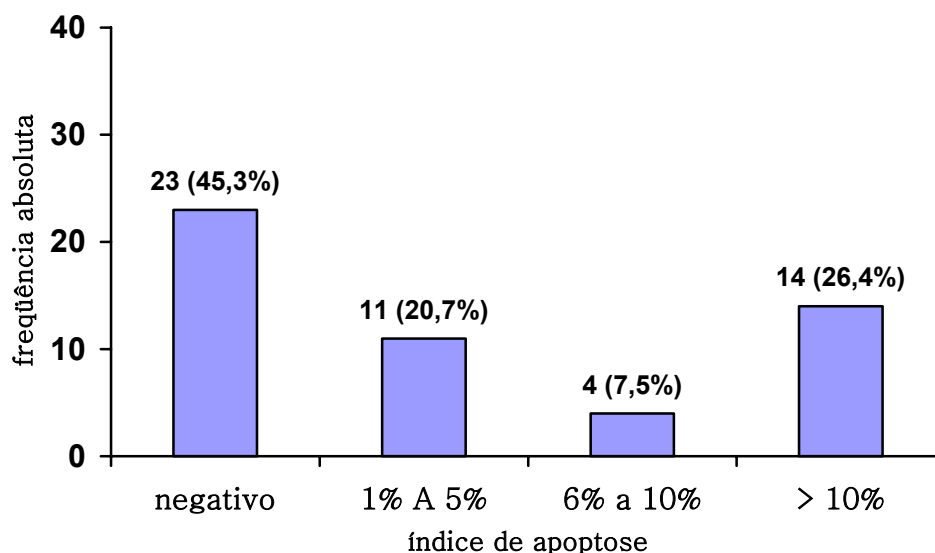
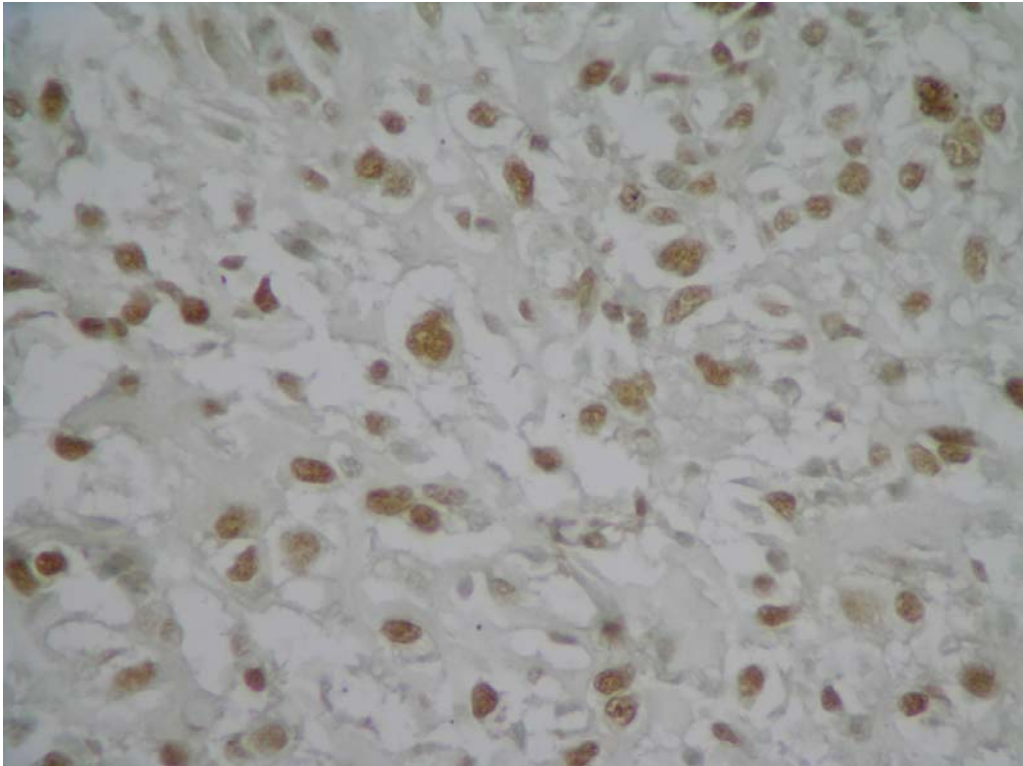


Figura 19 – Resultado do índice de apoptose

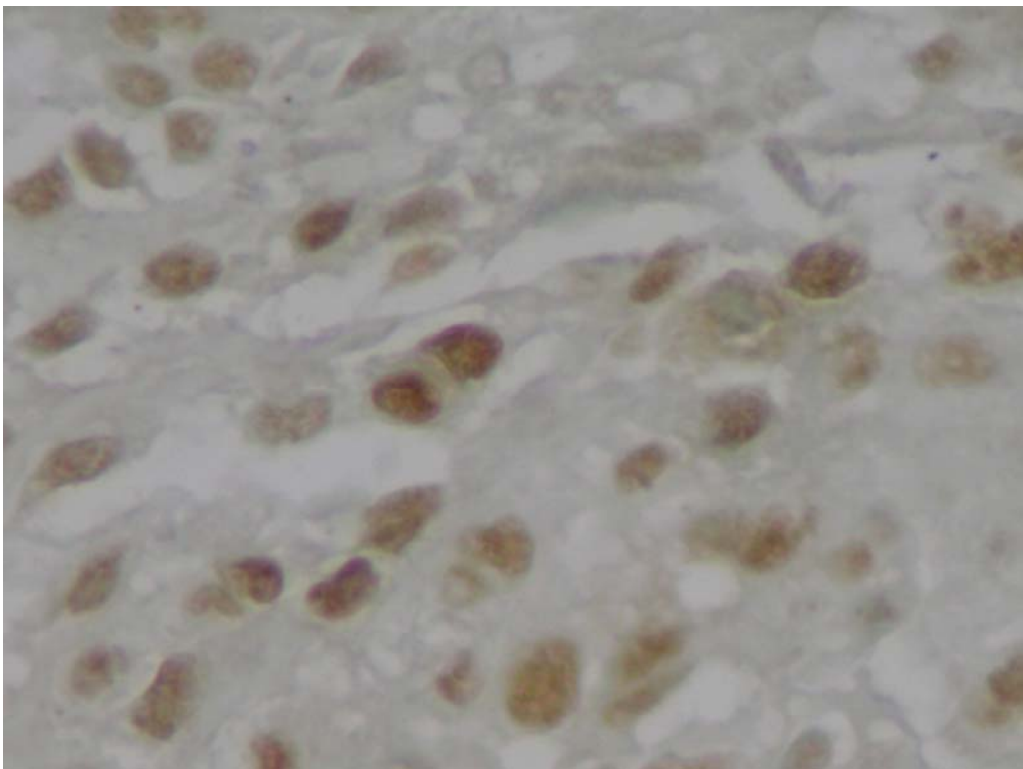
### 5.15 Análise da sobrevida

No grupo completo, de 69 pacientes, 29 (42,0%) estavam vivos ao final do estudo, com média de seguimento de 76,4  $\pm$ 45,3 meses (19-183 meses) e quarenta (57,9%) faleceram, em média, 24,4  $\pm$ 20,4 meses (três a 93 meses), após o diagnóstico. A taxa de sobrevida em cinco anos foi de 46,4% e de 32,5% para dez anos.

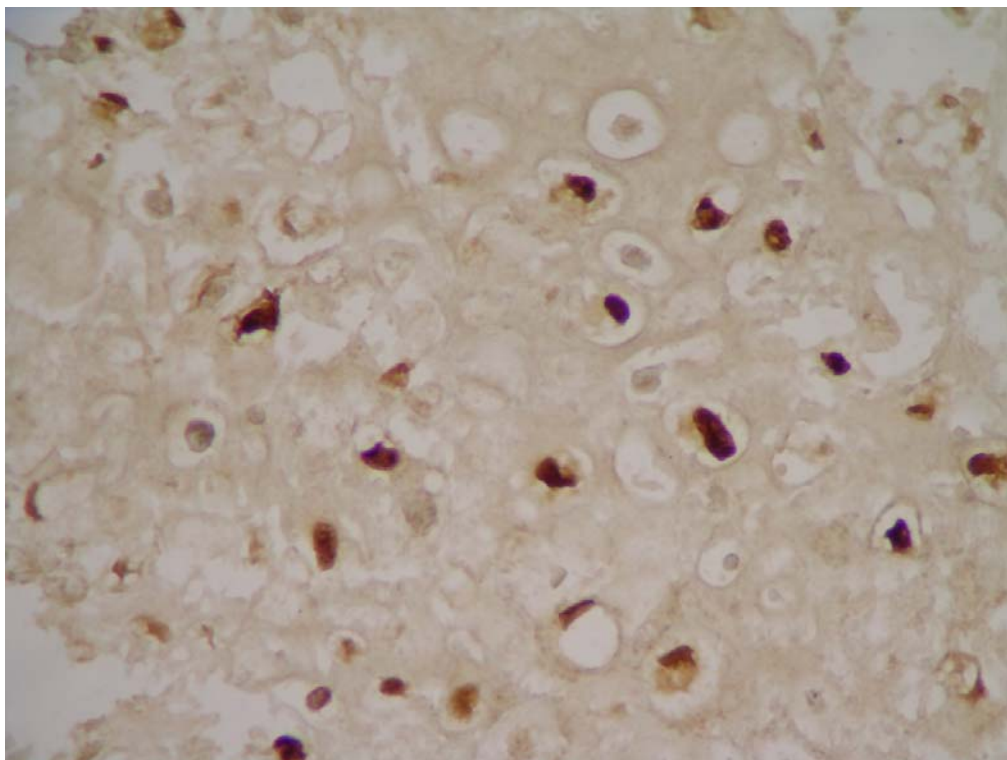
No grupo de 45 pacientes, 25 (55,5%) estavam vivos ao final do estudo, com média de seguimento de 80  $\pm$ 46,9 meses (25-183 meses) e vinte (44,4%) faleceram, em média 34,5  $\pm$ 21,6 meses (13-93 meses), após o diagnóstico. A taxa de sobrevida em cinco anos foi de 60,7% e de 44,3% para dez anos.



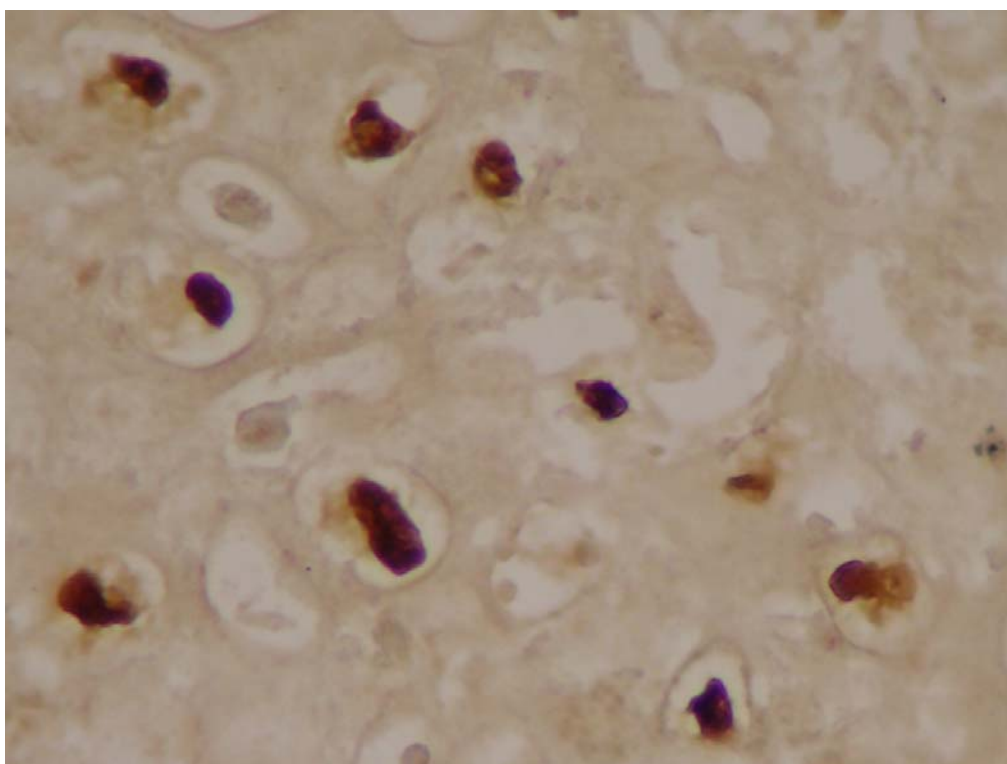
**Figura 17** – Imuno-histoquímica para p53. Células positivas com núcleos corados em marrom escuro (aumento 400X)



**Figura 18** – Imuno-histoquímica para p53. Células positivas com núcleos corados em marrom escuro (aumento 500X)



**Figura 20** – Corte histológico processado para apoptose pela técnica de Tunel. Células positivas com núcleos corados em marrom (aumento 400X)



**Figura 21**– Corte histológico processado para apoptose pela técnica de Tunel. Células positivas com núcleos corados em marrom (aumento 500X)



**Tabela 3** - Análise univariada da sobrevida, de acordo com as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e resultados dos testes de *log-rank* e Gehan-Breslow para comparação entre as curvas

variável	n	média sobre vida meses	erro padrão	sobre vida cinco anos %	sobre vida cinco anos erro padrão	sobre vida dez anos %	sobre vida dez anos erro padrão	p <i>log-rank</i>	p Gehan-Breslow
idade	< 19	38	70,6	13,5	44,1	8,15	24,1	0,480	0,625
	≥ 19	31	88,6	14,5	49,5	9,31	44,6		
sexo	M	41	76,7	13,1	41,7	8,0	29,2	0,770	0,932
	F	28	68,5	11,4	53,1	9,5	40,4		
localização do tumor	fêmur	33	68,2	12,7	41,8	8,7	28,9	0,360	0,382
	tíbia	23	82,1	18,7	46,1	10,8	30,7		
	outra	13	109,4	24,0	59,3	14,3	59,3		
histologia	osteoblástico	20	83,8	18,0	55,0	11,1	37,7	0,709	0,994
	osteoblástico	49	79,6	12,3	42,8	7,3	33,0		
estádio	I	2	---	---	---	---	---	0,028	0,026
	II	60	83,3	11,2	48,8	6,6	33,4		
	III	7	20,7	7,7	14,3	13,2	8,1		
tratamento	completo	55	98,8	12,0	58,2	6,8	40,8	< 0,001	< 0,001
	incompleto	14	8,9	7,5	---	---	---		
cirurgia	não realizada	6	9,0	1,5	---	---	---	< 0,001	< 0,001
	amputação	18	30,1	5,0	19,4	9,8	---		
	conservadora	45	103,2	13,3	63,4	7,3	44,0		
complicações tratamento	não	55	92,2	12,0	54,9	6,8	38,5	0,001	0,002
	sim	14	23,5	5,2	14,3	9,3	---		
grau necrose	I/II	27	13,9	63,2	33,3	9,0	23,8	0,004	0,006
	III/IV	31	15,3	109,4	69,5	8,5	50,6		
proteína p53	negativa	30	80,8	15,4	41,4	9,2	35,4	0,743	0,427
	positiva	23	68,1	15,8	52,5	10,4	18,3		
apoptose	menor 1	24	61,4	11,9	60,6	10,2	29,9	0,463	0,320
	1 a 5	11	43,5	9,6	39,8	16,3	---		
	6 a 10	4	93,0	---	---	---	---		
	maior 10	14	66,6	20,6	35,7	12,8	26,8		
sobrevida	grupo completo	69	80,6	10,5	46,4	6,1	32,5		
sobrevida	pacientes elegíveis	45	104,9	13,1	60,7	7,5	44,3		

## 5.16 Curvas de sobrevivência de acordo com método de Kaplan-Meier

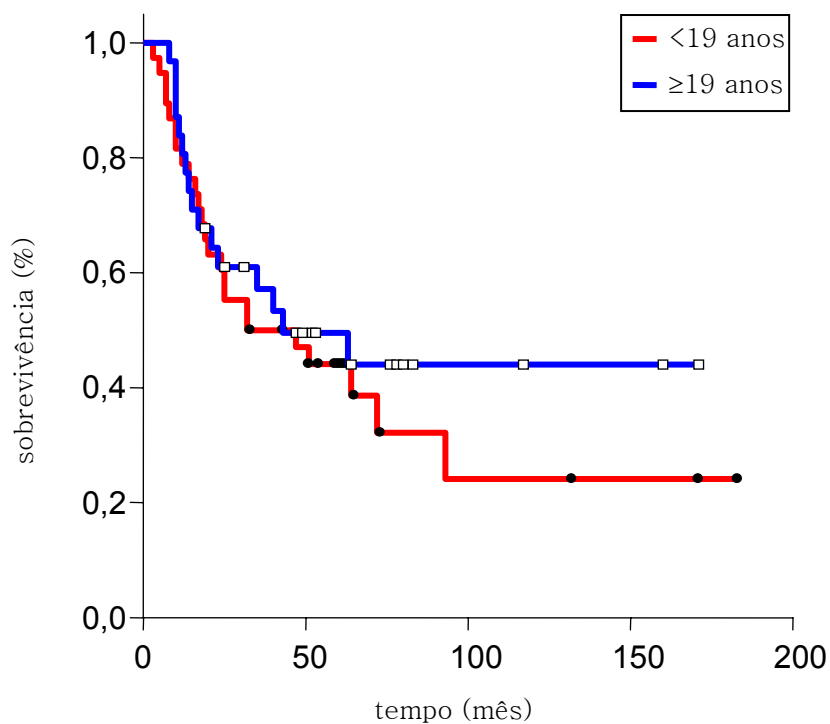


Figura 22 – Sobrevida e idade dos pacientes

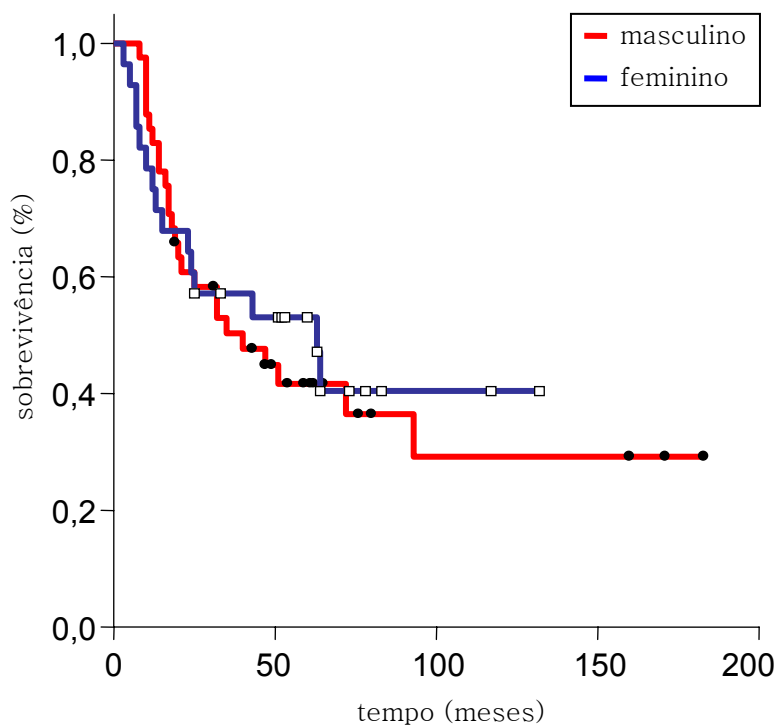


Figura 23 – Sobrevida e sexo dos pacientes

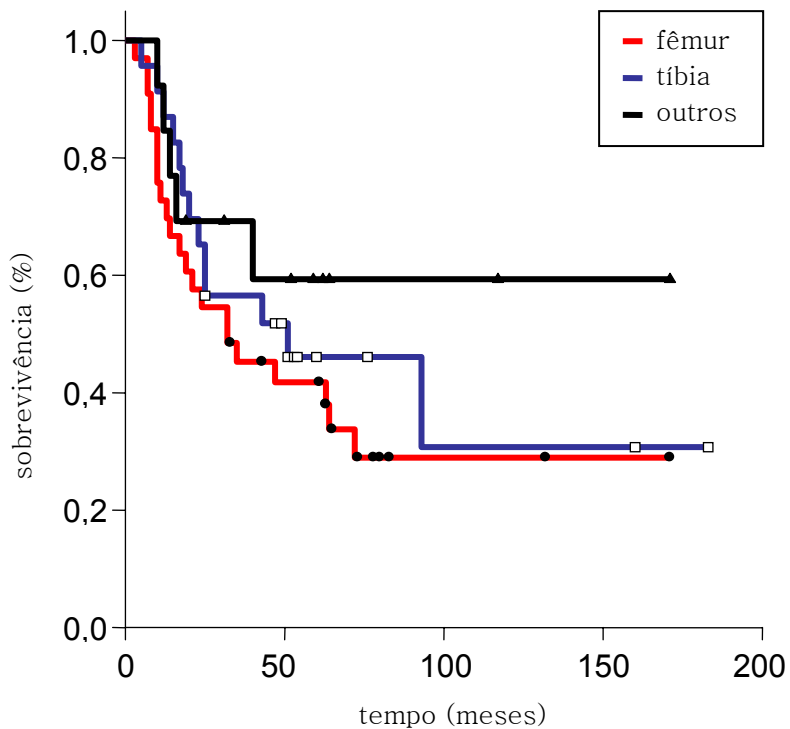


Figura 24 - Sobrevida e localização dos tumores

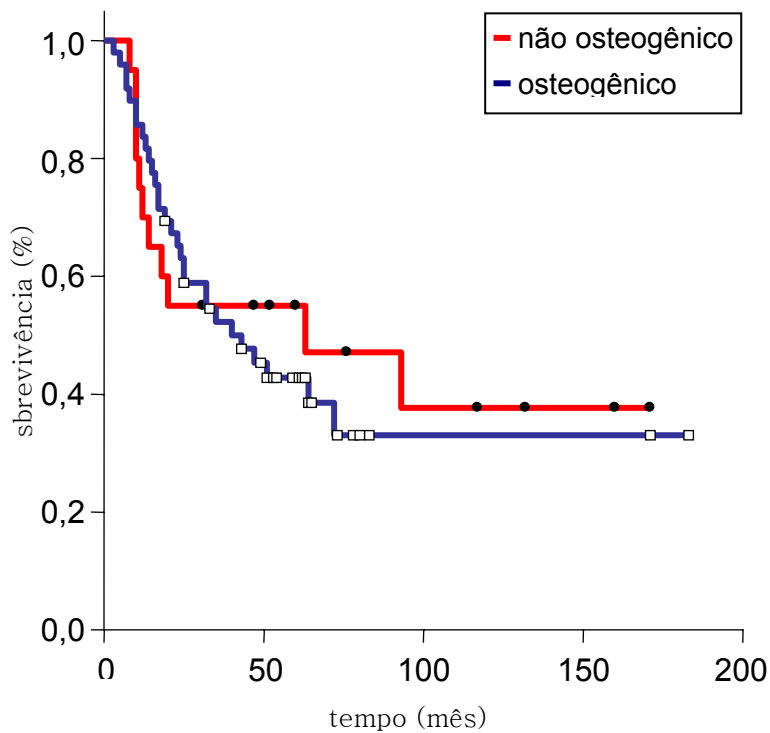


Figura 25 - Sobrevida e histologia predominante

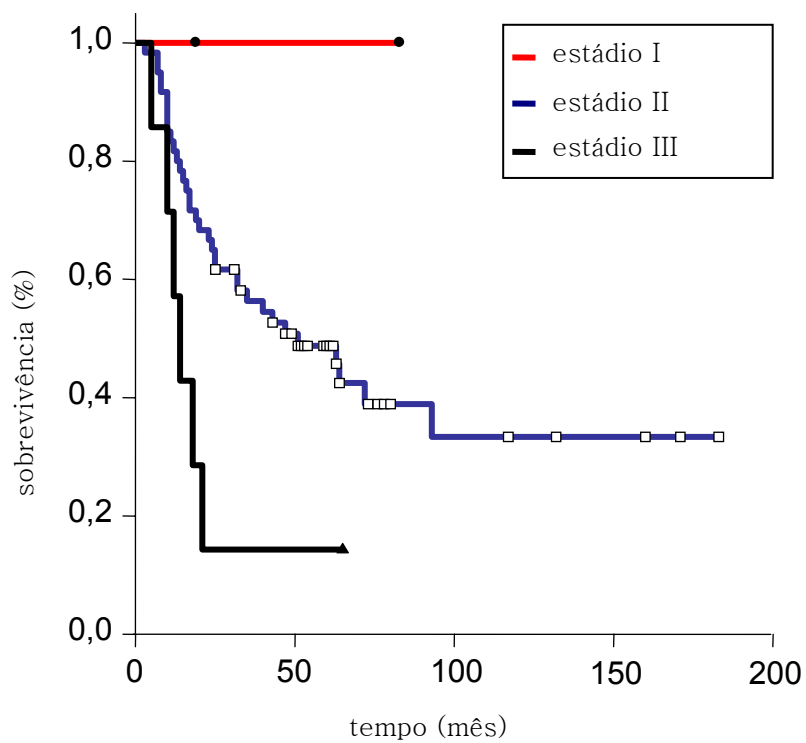


Figura 26 - Sobrevida e estadiamento

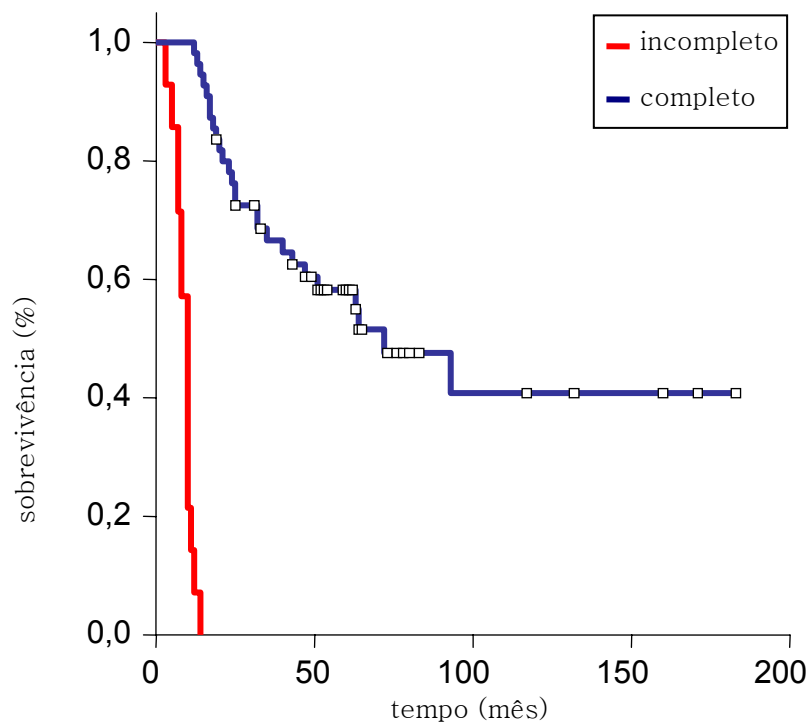


Figura 27 - Sobrevida e adesão ao tratamento

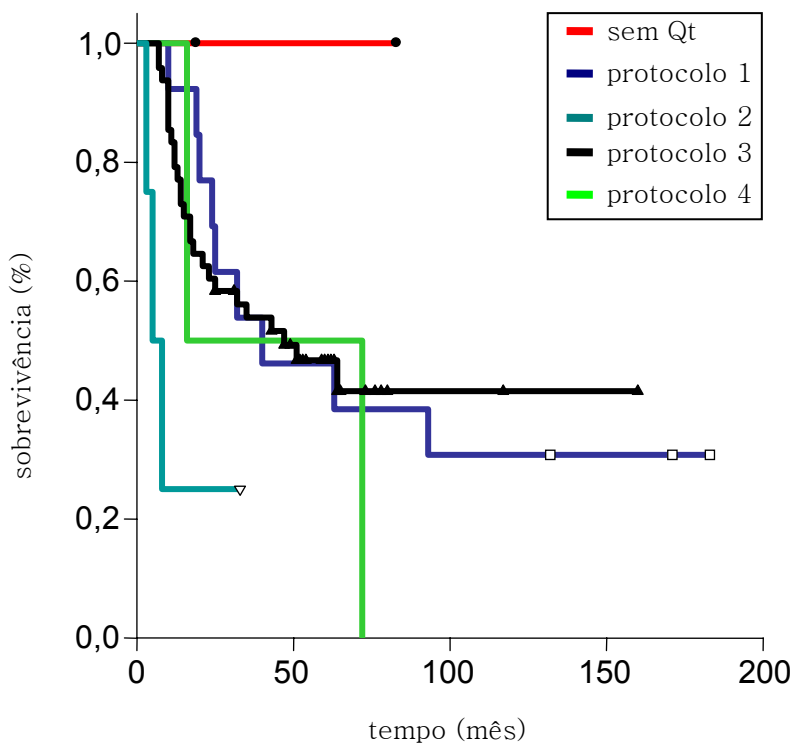


Figura 28 – Sobrevida e protocolo de quimioterapia indicado

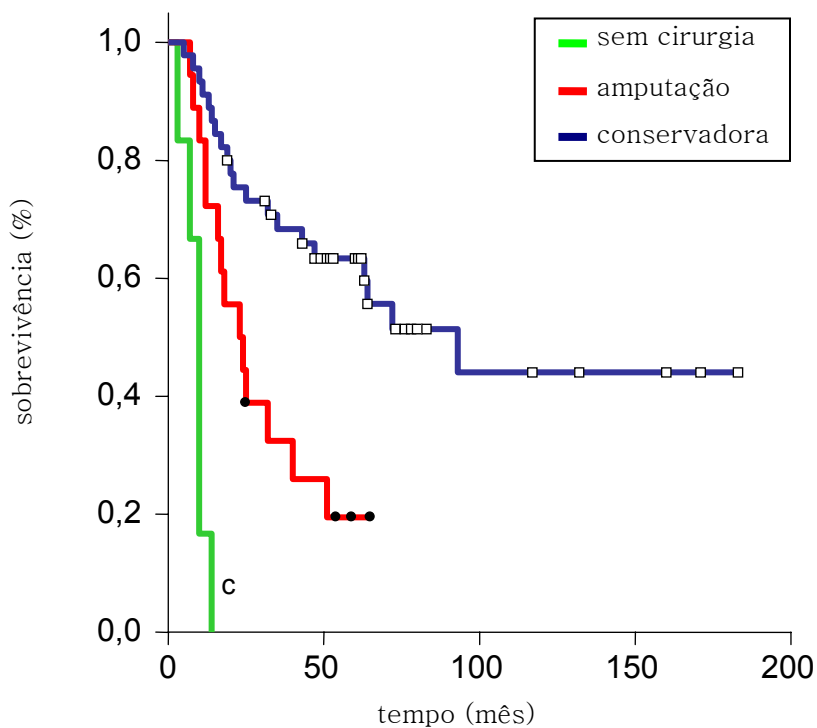


Figura 29 – Sobrevida e cirurgia tumor primário

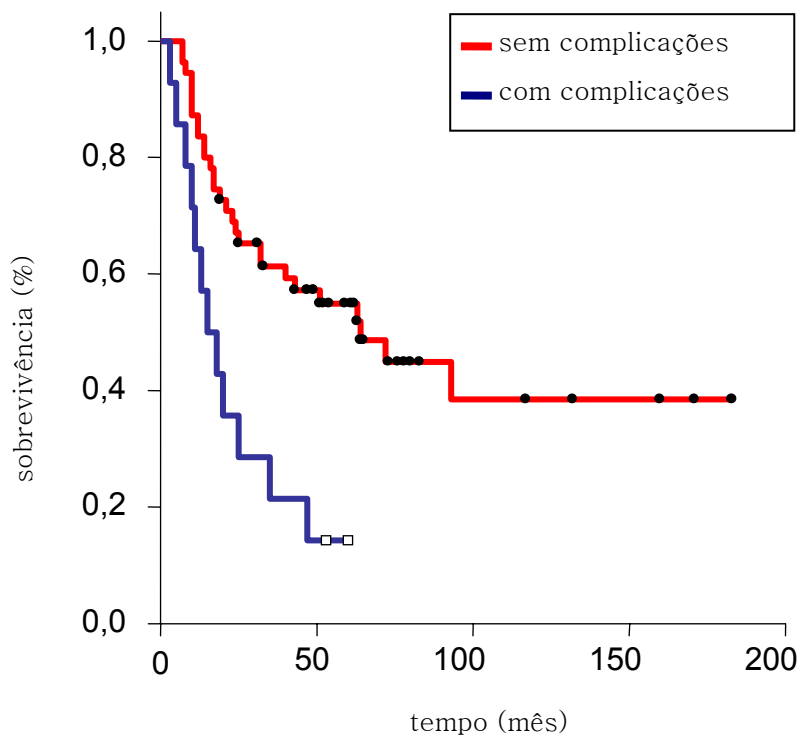


Figura 30 - Sobrevida e complicações do tratamento

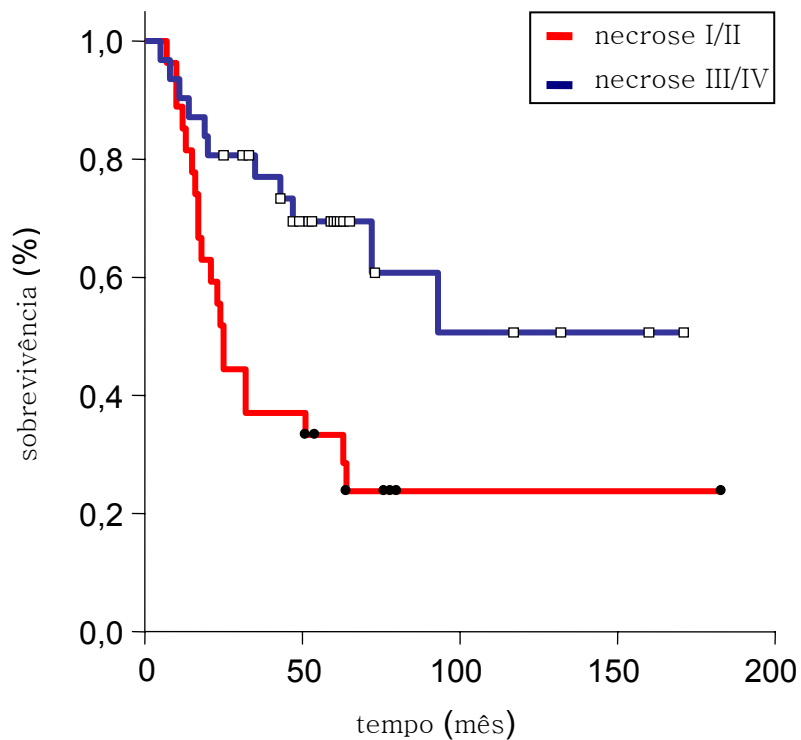


Figura 31 - Sobrevida e grau de necrose

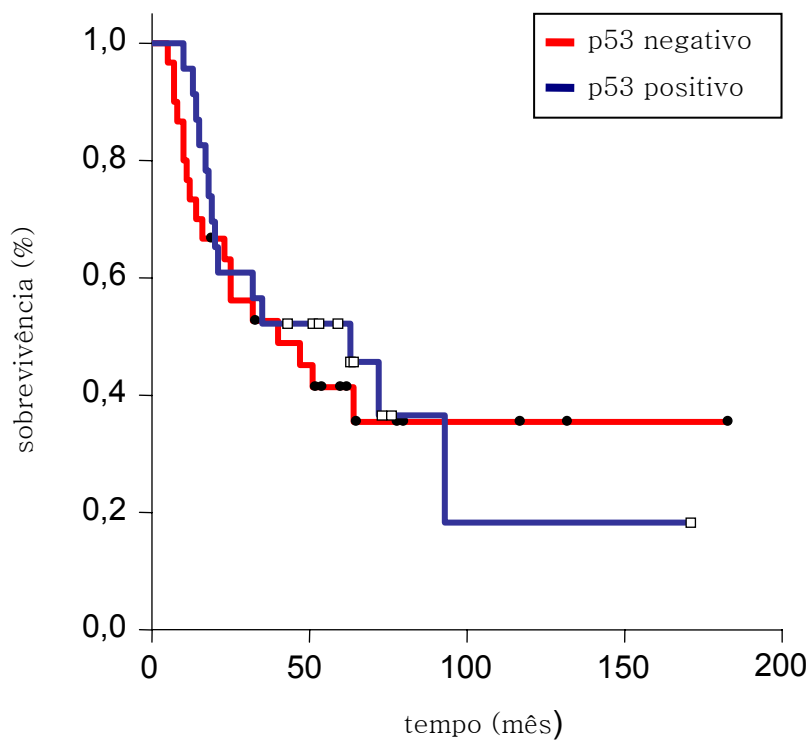


Figura 32 – Sobrevida e expressão da proteína p53

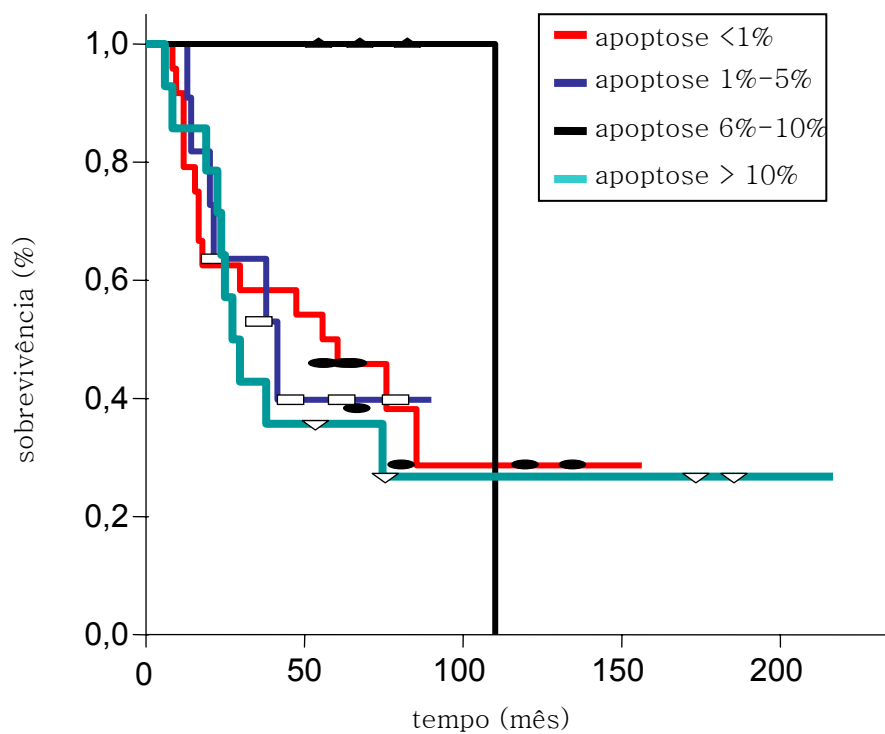


Figura 33 – Sobrevida e índice de apoptose

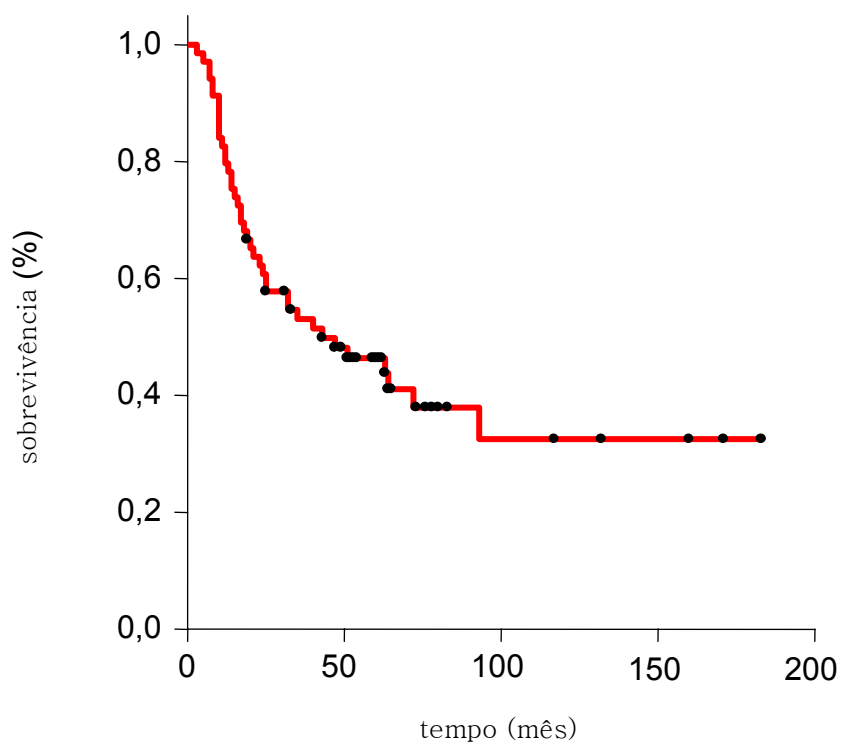


Figura 34 – Sobrevida: grupo completo

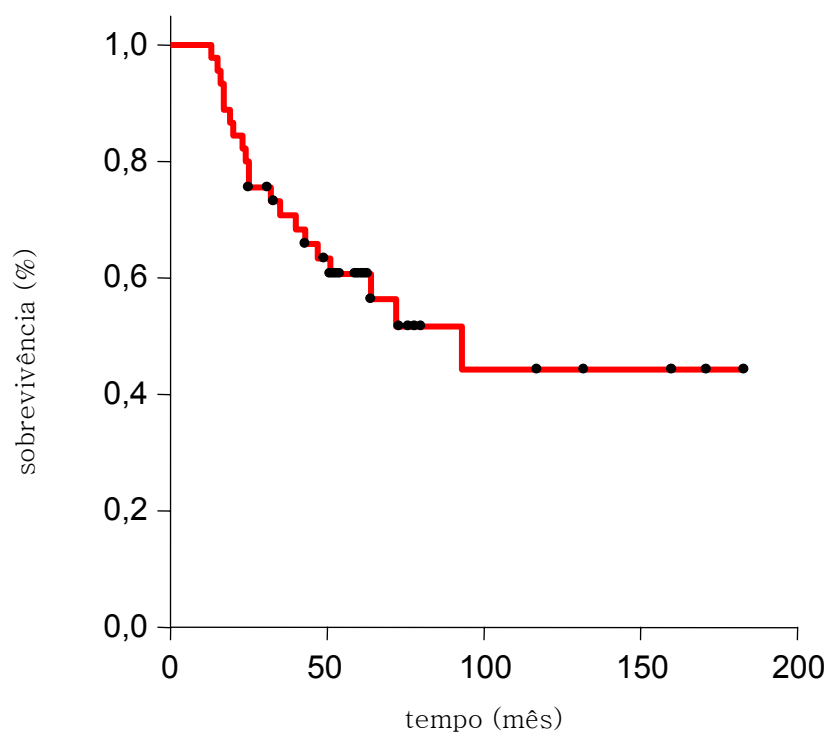
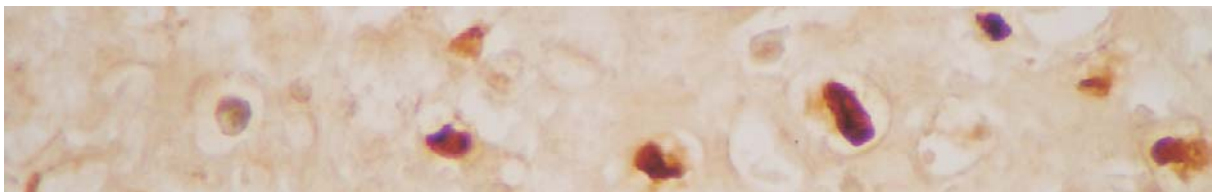


Figura 35 – Sobrevida: pacientes elegíveis



# Discussão





## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Casuística

A análise da distribuição e frequência das variáveis estudadas mostra que a amostra estudada é semelhante às apresentadas na literatura sobre osteossarcoma.

Como na maioria dos trabalhos, as variáveis, idade, sexo, tipo histológico e localização do tumor, não apresentaram associação com sobrevida.

### 6.2 Estadiamento

Considerando o estadiamento inicial, a maioria dos pacientes apresentava, ao diagnóstico, tumores no estágio II e sete (10,1% do total de pacientes) tumores no estágio IIIB, em acordo com o referido na literatura. Embora o número de pacientes com metástases ao diagnóstico seja semelhante aos encontrados na literatura, foi inferior ao reportado por Rech et al. (2004) e Petrilli et al. (2006), em trabalhos conduzidos no Brasil. Rech et al. (2004) encontraram, ao diagnóstico, doença metastática em 19 pacientes (38%) e Petrilli et al. (2006), 20,9%.

A diferença de frequência de pacientes com metástases pulmonares, pode ser atribuída à amostra estudada. Quando o estudo é restrito somente a pacientes com tumores centrais e de alto grau, pode haver em maior número de pacientes com doença avançada que aqueles que incluem todos os tipos de osteossarcoma. Grande parte dos trabalhos sobre osteossarcoma, sobretudo os que analisam protocolos de tratamento, apresentam, somente, pacientes com tumores estádios II e III.

A diferença também pode ser em consequência do método utilizado na detecção de metástases, especialmente as pulmonares. Neste trabalho,

como a tomografia computadorizada nem sempre esteve disponível, adotamos a radiografia de tórax biplanar, realizada em todos os pacientes, como referência para a informação da presença de metástases pulmonares ao diagnóstico.

A tomografia computadorizada detecta pequenos nódulos não visualizados na radiografia convencional de tórax e é mais eficaz na identificação precoce de metástases pulmonares (Heare et al., 1989). No entanto, pode demonstrar, falsamente, maior número de pacientes com metástases, pois é exame muito sensível e pouco específico e, por conseqüência, lesões inflamatórias poderão ser interpretadas como metástases (Garcia Filho et al., 2002a).

A maioria dos autores citados utilizou a tomografia do tórax na avaliação rotineira inicial dos pacientes com osteossarcoma em busca de metástases pulmonares ao diagnóstico (Kaste et al., 1999; Bacci et al., 2002c; Petrilli et al., 2006; Varan et al., 2007).

Kager et al. (2003), que encontrou 11,4%, dos pacientes com metástases ao diagnóstico, utilizava radiografia plana nos pacientes avaliados antes de 1991. A tomografia computadorizada era indicada, somente em algumas situações, de acordo com a disponibilidade e tornou-se rotina após 1991.

Em concordância com a literatura (Mankin et al., 2004; Rech et al., 2004; Mialou et al., 2005; McTiernan et al., 2006; Petrilli et al., 2006), foi encontrada associação, estatisticamente significativa entre estadiamento e prognóstico, com pacientes com tumores estágio III apresentando pior prognóstico. Nesta investigação, apenas um (14,2%) dos sete pacientes com metástases pulmonares ao diagnóstico continua vivo, cinco anos após o diagnóstico inicial.

## 6.3 Tratamento

Neste estudo, seis pacientes, correspondendo a 8,6% do total, efetivamente abandonaram o tratamento,

Petrilli et al. (2006) reportaram que 6,7% dos pacientes não completaram o tratamento. Chybicka et al. (1998) relataram que apenas um (3,5%) de 28 pacientes recusou-se a continuar o tratamento. Howard et al. (2007) relataram taxa de abandono de 8%, quatro do total de 50 pacientes.

Neste estudo, assim como identificado por Petrilli et al. (2006), os pacientes que abandonaram o tratamento foram os que haviam recebido indicação para amputação em razão da grande dimensão tumoral ou da progressão da doença em vigência de quimioterapia.

Petrilli et al. (2006) atribuíram a recusa à amputação às crenças culturais. No entanto, a reversão na expectativa, causada pela má resposta obtida com o tratamento, também poderia influenciar na decisão de abandonar o tratamento.

### *6.3.1 Tratamento quimioterápico*

Sessenta e sete pacientes receberam quimioterapia previamente à cirurgia conforme protocolo estabelecido, que variou de acordo com a época do diagnóstico. Sendo assim, quatro diferentes protocolos de tratamento foram aplicados durante o período de observação.

Comparando resultados do tratamento quimioterápico, do protocolo três com o quatro, foi identificada diferença estatisticamente significativa ( $p=0,00132$ ) somente com a aplicação do teste de Gehan-Breslow, que se aplica mais acuradamente à análise das curvas em seu início.

Dos quatro pacientes tratados conforme o protocolo quatro, três faleceram por complicações de natureza séptica determinando, nesse grupo, média de sobrevida muito baixa (12,2 meses), provavelmente em virtude das

complicações e não da aplicação do tratamento. Assim, é recomendada investigação com número maior de amostras e maior tempo de observação.

### *6.3.2 Tratamento cirúrgico*

O tipo de cirurgia realizada para a ressecção do tumor primário apresentou associação significativa com sobrevida.

Pacientes submetidos à cirurgia conservadora apresentaram tempo de sobrevida mais longo que pacientes submetidos à amputação. Entretanto, o tipo de cirurgia realizada, é indicador indireto de prognóstico. Atualmente as cirurgias de amputação e desarticulação são mais indicadas para pacientes com tumores avançados, geralmente de grande volume, ou que não responderam ao tratamento quimioterápico neo-adjuvante.

Por meio do teste de Goodman (Goodman 1964, 1965), verificamos associação significativa ( $p < 0,05$ ) entre procedimento cirúrgico e o grau de necrose. Os graus de necrose I/II foram associados a maior número de pacientes amputados que a cirurgia conservadora e o contrário ocorreu com os graus de necrose III/IV. Também é mais freqüente o procedimento de amputação na ocorrência de graus I/II enquanto que a cirurgia conservadora é mais freqüente nos graus III/IV. Estes resultados são indicativos de que, para a maioria dos pacientes submetidos à amputação, o tratamento quimioterápico pré-operatório foi pouco efetivo.

No presente estudo, 63 pacientes aceitaram o tratamento cirúrgico proposto. Desses, 45 (71,4%) foram submetidos à ressecção do tumor com preservação do membro acometido. Nos demais foi realizada a amputação ou a desarticulação.

O aumento do número de cirurgias conservadoras pode ser constatado na maioria dos trabalhos da literatura. Petrilli et al. (2006) refere taxa de 65,8% de cirurgia conservadora. A taxa de amputação foi de 34,1%.

Em trabalho publicado em 1991 (Petrilli et al., 1991) relataram taxa de cirurgia conservadora de 38,4%.

De maneira semelhante, Bacci et al. (2005b) constataram que, de 1972 a 1999, a taxa de cirurgia conservadora aumentou de 20% para 71%. Ferrari et al. (2005) relataram taxa de cirurgia conservadora superior a 90% em pacientes portadores de osteossarcoma de extremidades tratados entre os anos de 1997 e 2000.

### *6.3.3 Complicações do tratamento*

As complicações mais graves e freqüentes encontradas no decorrer do tratamento foram choque séptico, recidiva local e infecção no sítio cirúrgico.

Dos 67 pacientes submetidos a tratamento quimioterápico, completo ou incompleto, quatro (5,9%) morreram por choque séptico. Petrilli (2005), relatou que 15 pacientes faleceram devido à toxicidade da quimioterapia, o que totaliza 13,6% de todos os óbitos. Ferrari et al. (2005) observaram que apenas 1,6% dos pacientes faleceram em decorrência da toxicidade do tratamento. Bacci et al. (2003) relataram somente um óbito, em 46 pacientes (2,1%), decorrente da toxicidade da quimioterapia.

Entre os 63 pacientes que foram submetidos a tratamento cirúrgico, dez (15,8%) apresentaram complicações, seis com recidiva local (9,5%) e quatro com infecção no sítio cirúrgico (6,3%).

Todos os casos de infecção aconteceram após cirurgia conservadora, sendo três após colocação de endoprótese e um após cirurgia de ressecção e substituição, resultando em taxa de 6,3% do total de cirurgias e 8,8% do total de cirurgias conservadoras.

Encontramos, neste trabalho, taxas de infecção ligeiramente mais baixas que as relatadas pela literatura. Marina et al. (2004) reportam que, em pacientes com osteossarcoma submetido à cirurgia para colocação de

endopróteses, é grande o risco de infecção, com taxas de até 35%. Wirganowicz et al. (1999) relatam taxas de infecção em 13%. McDonald et al. (1990) consideram a infecção como complicação mais comum e relatam taxa de 11,8%. Mankin et al. (2004) constataram taxa de infecção cirúrgica de 10%.

A ocorrência de infecção em cirurgia, em pacientes portadores de osteossarcoma, sobretudo naqueles com quimioterapia prévia com necessidade de se manter tratamento quimioterápico no pós-operatório, é motivo de constante preocupação entre os cirurgiões oncológicos. Na ocorrência de infecção e diante da necessidade de retomar o tratamento quimioterápico é imperativo que se tome, o mais breve possível, a decisão pelo tratamento definitivo e resolutivo do processo infeccioso, o que pode significar amputação do membro acometido.

Todos os pacientes deste estudo, com infecção local sofreram amputação. Dois permanecem vivos e dois morreram, em média, 27 meses após o diagnóstico.

Lee et al. (2002) relataram ocorrência de infecção em 12,4% dos pacientes submetidos à colocação de endoprótese. Constataram o desenvolvimento de metástases pulmonares em pacientes com infecção no sítio cirúrgico cuja quimioterapia foi postergada ou interrompida e, por esse motivo, consideraram infecção local como fator de mau prognóstico.

As taxas de recidiva local, em relação ao número de pacientes operados, ao número de pacientes submetidos à cirurgia conservadora e à colocação de endoprótese foram, respectivamente, 9,5%, 11,1% e 12,8%. Do total de cirurgias de amputação realizadas, apenas um caso (5,5%) apresentou recidiva local.

Bacci et al. (1998c, 2006a) reportaram taxas de recidiva local em relação ao número total de pacientes operados de 6% e 4,8%. Rodriguez-Galindo et al. (2004) relataram taxa 4% a 10%, enquanto Mankin et al. (2004) mostraram que 4% dos pacientes desenvolveram recorrência local. Grimer et al. (2002), em análise de pacientes submetidos a tratamento, em três centros



de referência, encontraram taxas de recidiva local, em relação ao número de cirurgias conservadoras, de 13,3%, 6,8% e 2,5%, Wirganowicz et al. (1999), por sua vez, encontraram 14% e Picci et al. (1994), 7%.

No Brasil, Petrilli (2005) reportou 21 casos de recidiva local em 202 pacientes (10,3%). Dos 133 pacientes submetidos à cirurgia conservadora, 19 (14,2%) apresentaram recidiva local. Quatorze ocorreram em pacientes que receberam endoprótese, representando 14,4% de recidiva para esse tipo de cirurgia. Atribuiu as taxas mais altas encontradas à dificuldade de se aceitar, dentro da cultura brasileira, a proposta de amputação do membro acometido.

Bacci et al. (1998c, 2006a) e Rodriguez-Galindo et al. (2004) relacionaram recorrência local à má resposta ao tratamento quimioterápico. Para Picci et al. (1994,1997), a mais forte associação com recorrência local é a resposta à quimioterapia, seguida por margens cirúrgicas inadequadas.

Neste trabalho, dos pacientes que apresentaram recidiva local, cinco (83,3%) apresentaram, na peça cirúrgica, grau de necrose I/II e apenas um, grau III. Embora não tenha sido possível demonstrar associação estatisticamente significativa entre grau de necrose e recidiva, o valor de  $p = 0,057$ , evidencia tendência de recidiva nos pacientes que apresentaram baixo grau de necrose pós-tratamento quimioterápico neo-adjuvante.

Habitualmente, a maioria dos pacientes com recorrência local é, posteriormente, submetida à amputação. Esses pacientes apresentam risco, significativamente maior, de desenvolver metástases pulmonares e de morte, em virtude da progressão da doença (Wirganowicz et al., 1999; Rodriguez-Galindo et al., 2004; Bacci 2006a).

As taxas de mortalidade em pacientes com recorrência local são altas. Mankin et al. (2004) relataram que, entre vinte pacientes que desenvolveram recorrência local, somente seis sobreviveram. Bacci et al. (1998c) relataram 87% de mortalidade e no estudo conduzido por Scully et al. (1996) todos os pacientes que desenvolveram recorrência local, faleceram.

Da mesma forma, neste trabalho, todos os pacientes com recorrência local, mesmo posteriormente amputados, faleceram em média 21,3 meses ( $\pm 13,6$ ) após o diagnóstico.

#### **6.4 Resposta histológica à quimioterapia pré-operatória**

A resposta histológica à quimioterapia pré-operatória é considerada um dos fatores prognósticos mais importantes nos osteossarcomas. No entanto, não permite identificar, ao diagnóstico, quais pacientes responderão efetivamente ao tratamento proposto, pois só pode ser avaliada após o início do tratamento (Davis et al., 1994; Bielack et al., 2002). A limitação fica ainda maior com a constatação de que as terapias alternativas ou de resgate, indicadas no período pós-operatório, para pacientes com grau de necrose inferior a 90%, não foram capazes, com raras exceções, de melhorar o curso clínico desses pacientes (Meyers et al., 1992; Bacci et al., 1993; Marina et al., 2004; Man et al., 2005; Petrilli et al., 2006).

Pelo critério de Huvos (1991), a quantidade de necrose induzida pela quimioterapia pré-operatória é agrupada em quatro graus, porém considera-se que pacientes com mais de 90% de necrose na peça tumoral ressecada (graus de necrose III e IV) apresentam melhor prognóstico que pacientes com tumores com menos de 90% de necrose na peça de ressecção (graus I e II) (Entz-Werle et al., 2003; Mankin et al., 2004; Rech et al., 2004; Petrilli et al., 2006).

Considerando-se todos os protocolos de tratamento e, nos pacientes em que a análise foi possível, identificou-se 31 pacientes (53,4%), com resposta favorável (graus III/IV) e 27 pacientes (46,5%) com resposta desfavorável (graus I/II).

Na análise efetuada, grau de necrose apresentou associação estatisticamente significativa com sobrevida, confirmando resultados previamente publicados.

## 6.5 Sobrevida

As taxas de sobrevida referentes aos pacientes com osteossarcoma variam de acordo com a amostra e características dos tumores. Provavelmente, em virtude dessa diversidade, as taxas de sobrevida são referidas na literatura em percentuais muito diferentes (Bacci et al., 2002 a,b, 2004b; Bielack et al., 2002; Varan et al., 2007).

A análise da taxa de sobrevida foi realizada considerando-se dois grupos. Grupo A, constituído por todos os pacientes com diagnóstico de osteossarcoma que se apresentaram para tratamento nos dois hospitais. Grupo B, constituído por pacientes portadores de osteossarcoma de alto grau, de extremidades, virgens de tratamento, estágio IIB e que realizaram todo o tratamento, determinando-se assim, grupo mais homogêneo, para comparação com a literatura.

No grupo A, a taxa de sobrevida média foi de 80,6 meses ( $\pm 10,5$ ). A sobrevida atingiu 46,4% ( $\pm 6,1$ ) em cinco anos e 32,5 ( $\pm 7,6$ ) em dez anos. No grupo B, a taxa de sobrevida média foi de 104,9 meses ( $\pm 13,1$ ). A sobrevida atingiu 60,7% ( $\pm 7,5$ ) em cinco anos e 44,3% ( $\pm 10,1$ ) em dez anos. As diferenças entre os grupos são explicadas pelas diferenças na amostra. A exclusão, no grupo B, dos pacientes com tumores metastáticos ao diagnóstico e dos pacientes que não completaram o tratamento, fatores de mau prognóstico, determinou aumento da taxa de sobrevida.

Bielack et al. (2002) encontraram taxas de sobrevida em cinco, dez, e 15 anos, de 65,3%, 59,8%, e 57,3%, respectivamente, em pacientes com idade inferior a 40 anos, com osteossarcoma primário, central, não metastático, tratados antes de 1998, com regimes terapêuticos diferentes.

Rech et al. (2004) relataram, em pacientes com osteossarcoma de alto grau tratados entre 1992 e 2001, probabilidade de sobrevida em cinco anos, de 33,2%  $\pm 7,2\%$ , com média de seguimento de 36,7 meses (6-126).

Petrilli et al. (2006) reportaram taxas de sobrevida em cinco e dez anos para pacientes com menos de 25 anos de idade, portadores de osteossarcoma de extremidades e de alto grau, tratados entre 1991 e 1996 e entre 1996 e 1999, de 54,2% e 50% e de 48,3% e 43,5%, respectivamente. Em análise incluindo todos os estudos, excluindo os pacientes metastáticos, a probabilidade de sobrevida em cinco e dez anos aumentou para 60,5% e 55,2%, respectivamente.

Damron et al. (2007) consideraram pacientes com diagnóstico de osteossarcoma tratados em diferentes regimes terapêuticos no período entre 1985 e 1998 e encontraram taxa de sobrevida de 53,9% para todos os pacientes. Por sua vez, Varan et al. (2007) reportaram taxa de sobrevida de 32,6% para todos os pacientes e de 41,7% para os portadores de tumores não metastáticos, com média de seguimento de 64,2 meses, em pacientes submetidos a diferentes esquemas de tratamento entre 1985 a 2004.

Os resultados da análise de sobrevida dos dois grupos foram semelhantes aos relatados na literatura.

## 6.6 Expressão da proteína p53

### *6.6.1 Metodologia*

Há dois métodos mais utilizados para detecção da proteína p53: imuno-histoquímico e pesquisa de mutação após amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Pinho, 2000).

O método imuno-histoquímico permite a visualização direta, por microscopia óptica, da quantidade de proteína p53 existente nas células, pela coloração dos anticorpos específicos. Essa técnica está disponível em grande parte dos laboratórios de referencia em Anatomia Patológica e deve ser analisada considerando-se as limitações (Pinho, 2000).

A pesquisa da mutação do gene *TP53* pelo método do PCR é mais precisa, pois permite que se faça a análise da seqüência específica dos pares de bases existentes no gene. É mais cara, demorada e de difícil aplicabilidade em larga escala, porém, mais sensível (Pinho, 2000).

No presente estudo utilizou-se a técnica imuno-histoquímica, que pode ser empregada tanto em biópsias, quanto em espécimes cirúrgicos já processados e incluídos em blocos de parafina, para o estudo histopatológico convencional, o que torna possível a realização de estudos retrospectivos (Pinho, 2000). É apropriada, também, para a comparação de resultados, pois a maioria dos trabalhos prévios utilizou o estudo imuno-histoquímico (Klumb & Cavalcante Júnior, 2002).

Segundo Ribeiro Júnior et al. (2000) e Ribeiro Júnior & Safatle-Ribeiro (2006), é preciso cautela em relação às conclusões, uma vez que a detecção da proteína p53 pelo método imuno-histoquímico não reflete, necessariamente, a ocorrência de mutação no gene *TP53*.

A presença de coloração positiva para p53 não implica, necessariamente, em mutação. Podem ocorrer disfunções nessa proteína, causadas por mecanismos não relacionados à alteração do gene. Pettit et al. (2001) observaram a existência de alterações na proteína p53 em leucemias com gene normal. Mousses et al. (1996) encontraram p53 positivo em quatro sarcomas sem mutação detectável nos genes. Além disso, a proteína detectada nem sempre é mutante. Proteínas selvagens podem se acumular em algumas células após exposição a agentes que lesam o DNA e os anticorpos anti p53, correntemente usados em imuno-histoquímica, podem não distinguir a forma mutante da selvagem (Fett-Conte & Salles, 2002; Klumb & Cavalcanti Júnior, 2002; Pakos et al., 2004). Da mesma maneira, nem todas as mutações determinam proteínas estáveis, pois mutações do tipo *nonsense* podem gerar proteínas truncadas e instáveis, não detectadas pela imuno-histoquímica (Klumb & Cavalcanti Júnior, 2002; Pakos et al., 2004).

Para Wunder et al. (2005), em trabalho com pacientes portadores de osteossarcoma, a análise molecular é melhor que a imuno-histoquímica, que identifica somente mutações do tipo *missense*.

Pakos et al. (2004), em revisão sistemática com metanálise de 16 estudos com 499 pacientes, com utilização da técnica de imuno-histoquímica, PCR e imuno-histoquímica mais PCR, verificaram que, nem a expressão da proteína p53 detectada por imuno-histoquímica e nem a detectada por PCR em pacientes com osteossarcoma, foram capazes de identificar bons ou maus respondedores à quimioterapia. No entanto, nos estudos que avaliaram alterações no gene *TP53*, foi encontrada discreta associação com pior sobrevida em dois anos, fato que não foi evidenciado na análise pela imuno-histoquímica.

Mousses et al. (1996) verificaram, por método imuno-histoquímico, a expressão da proteína p53 comparativamente aos resultados do DNA e encontraram incremento da expressão da proteína p53 em oito, dos nove tumores com mutação no gene *TP53*.

Bodey et al. (1997) utilizaram antígenos imuno-histoquímicos para investigar a ocorrência de proteína p53 mutante em 43 amostras de osteossarcomas primários e sugeriram que alterações na proteína p53 podem ser detectadas precocemente pelo método imuno-histoquímico em várias neoplasias humanas, inclusive osteossarcomas.

Segundo Ribeiro Júnior et al. (2000) e Ribeiro Júnior & Safatle-Ribeiro (2006), existe associação entre hiperexpressão da proteína p53 e mutação do gene, especialmente quando ocorre coloração intensa.

### **6.6.2 Resultados**

A frequência de mutações no gene *TP53* e de proteína p53 positiva em pacientes com osteossarcoma primário, relatada por diferentes autores, varia de 3% a 100%, de acordo com a metodologia utilizada e amostra

analisada (Bodey et al., 1997; Strauss et al., 1992; Toguchida et al., 1992; Ueda et al., 1993; McIntyre et al., 1994; Guo et al., 1996; Tsuchiya et al., 2000; Ferrari et al., 2004).

No presente estudo encontrou-se reação positiva para a proteína p53 em 43,3% das amostras, em concordância com a literatura e com a hipótese de que a inativação da p53, é evento comum e precoce nos osteossarcomas (Bodey et al., 1997; Yokoyama et al., 1988; Diller et al., 1990; Miller et al., 1990; Chandar et al., 1992; Strauss et al., 1992; Yamaguchi et al., 1997; Radig et al., 1998; Gokgoz et al., 2001; Patiño-García et al., 2003).

No entanto, não foi encontrada associação entre expressão da proteína p53 e sobrevida, em acordo com os achados de Lonardo et al. (1997); Goto et al. (1998); Radig et al. (1998); Gorlick et al. (1999); Serra et al. (1999); Kakar et al. (2000); Oda et al. (2000); Trieb & Kotz (2001) e Pakos et al. (2004) e em desacordo com outras referências como Guo et al. (1996); Hasegawa et al. (1997); Papai et al. (1997); Uozaki et al. (2000); Park et al. (2001); Kawaguchi et al. (2002) e Ferrari et al. (2004), que mostraram que a expressão da proteína p53 em pacientes portadores de osteossarcoma pode ser relacionada à sobrevida.

Essa variação de resultados foi atribuída por Gokgoz et al. (2001) às diferenças na metodologia de verificação da expressão da proteína, à sensibilidade dos ensaios moleculares, à extensão das análises e ao tamanho da amostra. Para Klumb et al. (2002), a dificuldade em se normatizar a metodologia, além da provável subjetividade na interpretação dos resultados, podem explicar as discrepâncias entre os diferentes estudos. Os resultados podem diferir dependendo do anticorpo monoclonal utilizado, metodologia de incubação, variação na forma de recuperação antigênica e condições adversas na fixação do tecido.

Além do acima discorrido, de acordo com Soussi (2005), a inativação do gene *TP53* no câncer humano é processo complexo e

heterogêneo que pode fazer de cada tumor uma entidade única, dependente do tipo de tecido, das propriedades da proteína p53 mutante e do perfil genético do paciente e do tumor. Embora a grande maioria dos trabalhos publicados sugira alguma existência de associação entre a proteína p53 e câncer, a multiplicidade de mutações e respectivas propriedades tornam essa análise complexa em termos clínicos, biológicos e de prognóstico. Os eventos para a inativação e mutação do gene *TP53* são muito mais complexos do que o modelo simplista proposto nos anos 90, no qual, a mutação do gene seria sinônima da perda completa de atividade e o bastante para permitir o desenvolvimento tumoral. A perda dessa função é muito heterogênea; alguns genes mutantes conservam sua atividade parcialmente e outros a perdem completamente. Adicionalmente, são relatados polimorfismos naturais distribuídos heterogeneamente na população e que podem alterar a resposta do gene *TP53* em indivíduos normais, pois não apresentam exatamente as mesmas propriedades. Este polimorfismo leva à expressão de proteínas p53 distintas, com arginina e prolina no códon 72 e apresenta, por razões ainda desconhecidas, distribuição heterogênea na população em geral e está presente em 16% da população escandinava e em 63% por cento da população nigeriana. Os dois tipos de proteínas selvagens, p53<sub>arg</sub> e p53<sub>pro</sub>, não apresentam exatamente as mesmas propriedades; a p53<sub>arg</sub> tem maior atividade apoptótica e está mais associada à síndrome de Li-Fraumeni e a sarcomas esporádicos.

Os resultados obtidos no presente trabalho e a revisão da literatura possibilitam que se concorde com Soussi (2005) que considera incerta a relevância clínica da mutação do gene *TP53* e com Gokgoz et al. (2001), que afirmaram que o valor preditivo da proteína p53 em pacientes com osteossarcoma necessita de análises prospectivas.



## 6.7 Índice de apoptose

### 6.7.1 Metodologia

Existem várias técnicas de avaliação, estudo e quantificação da apoptose em cortes histológicos, todas com vantagens e limitações. A detecção de células apoptóticas pode ser baseada na morfologia celular, técnicas histoquímicas e bioquímicas do DNA fragmentado, eletroforese de DNA em gel de agarose, coloração com corantes fluorescentes, por citometria de fluxo ou pela detecção de proteínas que se expressaram durante o processo apoptótico (Kelly et al., 2003).

A microscopia eletrônica permite reconhecer e quantificar a apoptose pela identificação direta de alterações características das células em apoptose, ou seja, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, compactação de organelas citoplasmáticas e protuberâncias pedunculadas da superfície celular (Grotzer et al., 2001). Esse método é limitado, pois, o padrão morfológico pode se alterar em função de diferentes respostas, diferentes células e tecidos, diferentes mecanismos de lesão ou de diferentes vias apoptóticas utilizadas pela célula (Grotzer et al., 2001). Adicionalmente, os corpos apoptóticos com diversas formas, podem ser visualizados somente uma a três horas antes de serem completamente fagocitados. Por último, muito tempo e destreza são requeridos para o preparo dos cortes utilizados na microscopia eletrônica e para que não haja falhas quando for necessária a contagem de grande quantidade de células (Gavrieli et al., 1992).

A microscopia óptica com coloração pela hematoxilina e eosina permite reconhecimento das células apoptóticas, pois, fornece informações acerca do tamanho da célula, contorno celular, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (Gavrieli et al., 1992). No entanto, essa análise é subjetiva, requer muito tempo e está sujeita às mesmas limitações advindas da transitoriedade da aparência dos corpos apoptóticos, sendo

também passível de falha quando for necessária a contagem de grande quantidade de células. Além disso, exige muito cuidado para que não se confunda a infiltração linfocitária do tecido com núcleos de cromatina condensada dos corpos apoptóticos (Grotzer et al., 2001; Kelly et al., 2003; Pereira et al., 2003).

Neste estudo foi utilizado método histoquímico conhecido como Tunel, para verificar a ocorrência de apoptose nas biópsias de osteossarcomas. Essa técnica, inicialmente descrita por Gavrieli et al. (1992), é freqüentemente utilizada para a detecção de apoptose e foi utilizada na maioria dos estudos, facilitando a comparação dos resultados.

A técnica do Tunel detecta as alterações bioquímicas iniciais que ocorrem nas células apoptóticas antes que se manifestem alterações morfológicas. O DNA nuclear do material histológico é submetido a tratamento proteolítico e fragmenta-se. A enzima TdT marca o DNA fragmentado, particularmente, a porção terminal 3'-OH e a avidina peroxidase acentua essa marcação, permitindo identificação imuno-histoquímica das células em apoptose por microscopia ótica (Gavrieli et al., 1992).

A grande aceitação e utilização dessa técnica decorrem da facilidade em aplicá-la, bem como da sensibilidade e da possibilidade de quantificar as células em apoptose. É simples, resolutive, de fácil reprodução e pode ser feita com material de biópsias ou espécimes cirúrgicos já processados e incluídos em blocos de parafina (Gavrieli et al. 1992; Kelly et al., 2003; Pereira et al., 2003). Embora a enzima TdT seja mais seletiva para detectar células apoptóticas que necróticas, por se tratar de método não específico pode não discriminar as células apoptóticas das necróticas ou ainda, marcar núcleos de células não apoptóticas (Gavrieli et al., 1992).

Segundo Kelly et al. (2003), a sensibilidade do método varia entre 61% e 90%, a especificidade pode alcançar 87%, mas decresce para 70% quando a necrose predomina no material em estudo. Ainda assim, é o método

mais freqüentemente utilizado e essas limitações devem ser consideradas na análise dos resultados.

### **6.7.2 Resultados**

A quantidade de células em apoptose nos tecidos é comumente expressada pelo “índice de apoptose” ou IA. Esse índice é definido como a quantidade de células apoptóticas em relação ao total de células tumorais presentes ou ao número de campos analisados, ou à área estudada expressa em  $\text{mm}^2$ .

Adotamos neste trabalho, o índice que resulta do produto da divisão entre o número de células apoptóticas e o total de células tumorais contadas (duzentas) e multiplicadas por cem, para expressão em porcentagem. Por se tratar de material de biópsias, na maioria das vezes escasso, esse foi o número mínimo de células tumorais possíveis de serem contadas em todas as amostras analisadas. Sugamura et al. (1998), utilizaram mil células, Grotzer et al. (2001), cem, Shibakita et al. (2000), entre mil a duas mil células e Wu et al. (2004), definiram o IA em função do número de células apoptóticas presentes em quinhentas células.

A média do índice de apoptose no presente trabalho foi de 13,4%  $\pm$ 11,2% variando de zero até 36%. Apesar de ter sido encontrado apoptose no material estudado, não foi identificada associação entre índice de apoptose e sobrevida.

Conforme comentado na revisão da literatura, vários autores consideraram haver associação entre apoptose e prognóstico, para os mais diferentes tumores, sobretudo, carcinomas. Da mesma forma, prognósticos bons e ruins são associados, simultaneamente, a valores de índice de apoptose altos e baixos.

Os trabalhos analisados apresentaram grande variação no número de sujeitos, os tumores estudados não estavam no mesmo estágio clínico, as

opções de tratamento foram diferentes e a investigação das células em apoptose ocorreu em momentos distintos da progressão tumoral, desde a fase de pré-tratamento até pós-tratamento quimioterápico, radioterápico e cirúrgico. Além disso, a quantificação e identificação das células foram realizadas com métodos diferentes.

A análise comparativa dos resultados de trabalhos que utilizam metodologias diferentes deve ser feita com cuidado, em virtude da variação da sensibilidade e especificidade do método que cada estudo utiliza.

Para Pakos et al. (2004), a variação dos resultados encontrados ocorre em decorrência do tamanho da casuística, na maioria das vezes, de tamanho modesto, e pela inevitável variedade dos métodos utilizados.

Outro fator que contribui para a aparente discrepância de resultados é a inexistência de parâmetros que definam índice de apoptose alto ou baixo (Grotzer et al., 2001).

Entre os trabalhos que analisam apoptose e osteossarcoma, Pompetti et al. (1998) e Rytwinski et al. (2004) encontraram associação entre ocorrência de apoptose pós-quimioterapia e prognóstico, sendo a ocorrência de apoptose, indicadora do efeito da quimioterapia sobre as células tumorais e tal como o grau de necrose tornaria limitada a aplicação, pois, não identificaria, ao diagnóstico, quais pacientes teriam boa ou má resposta ao tratamento.

Apenas Wu et al. (2004) analisaram a ocorrência de apoptose pré-tratamento, e encontraram associação entre índices de apoptose mais elevados com sobrevida maior que três anos.

Adotamos neste trabalho, assim como Wu et al. (2004), a técnica de Tunel para verificação da ocorrência de apoptose em espécimes de biópsias pré-tratamento e, também, os mesmos critérios, adotados pelos autores, para agrupar os índices de apoptose identificados. Porém, não foi observada associação entre índice de apoptose e sobrevida. A diferença pode ser atribuída à provável subjetividade na interpretação da leitura das lâminas;

às condições de preservação dos tecidos fixados; à quantidade de necrose presente nos tecidos estudados, fator que pode diminuir a especificidade do método para determinação de células em apoptose, e os, já relatados, polimorfismos naturais, de distribuição heterogênea na população em geral, que podem alterar a resposta do gene *TP53* em indivíduos normais e, conseqüentemente, modificar a quantidade de células em apoptose.

Ainda que não tenhamos encontrado associação entre índice de apoptose e expressão da proteína p53 com sobrevida, as perspectivas com a biologia molecular se mantêm. Ensaio clínico prospectivo e multi-institucionais, para investigação de múltiplos aspectos moleculares em conjunto com variáveis clínicas e anatomopatológicas, rigorosamente planejados, com grande número de pacientes, tempo longo de seguimento, metodologia controlada e protocolos padronizados, podem contribuir para elevar a sobrevida de maior número de pacientes portadores de osteossarcoma.

# Considerações finais



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos progressos alcançados no tratamento de pacientes portadores de osteossarcoma, o prognóstico permanece incerto e o tratamento penoso.

A aplicação da mesma terapêutica, para a maioria dos pacientes, fundamentada tão somente no diagnóstico clínico, radiológico e histológico parece não ser mais suficiente para elevar o número de pacientes que apresentarão sobrevida mais longa.

Busca-se, como alternativa, aplicar tratamentos mais individualizados, de acordo com características do paciente e da doença. Mas, ainda não há como identificar, antes do início do tratamento, quais pacientes deverão ser submetidos a terapias diferenciadas, com exceção dos que se apresentam com metástases ao diagnóstico, a minoria.

Os conhecimentos sobre a biologia molecular melhoraram o entendimento sobre os múltiplos aspectos da carcinogênese. No entanto, embora, as perspectivas permaneçam, não houve até agora, benefícios para prevenção, diagnóstico, tratamento e seguimento dos pacientes com osteossarcoma.

Neste trabalho, com casuística de 69 casos de osteossarcoma com características clínicas e epidemiológicas semelhantes aos relatos da literatura, foi investigada a possível associação entre fatores clínicos, epidemiológicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos com o prognóstico; porém as respostas não foram diferentes daquelas já relatadas na literatura.

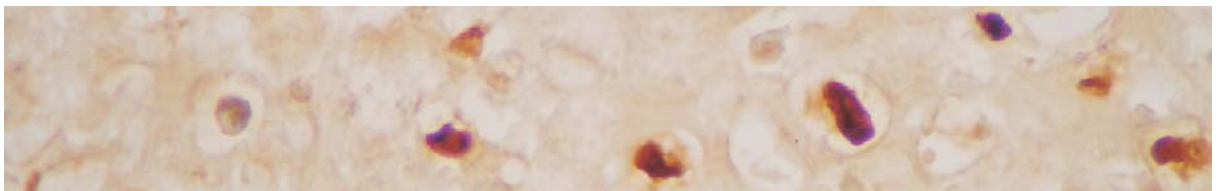
Talvez, somente um fator não seja suficiente para prever curso clínico dos pacientes com osteossarcoma. Em decorrência dos múltiplos, complexos e interdependentes eventos do processo carcinogênico, provavelmente, vários fatores devam ser considerados simultaneamente.

O osteossarcoma, felizmente, é doença rara. Mesmo para serviços de referência, é preciso muito tempo para formar casuística suficientemente

grande e com longo período de observação para respostas mais definitivas. Essa limitação poderia ser superada com trabalhos multi-institucionais, que analisassem aspectos moleculares e variáveis clínicas, epidemiológicas e anatomopatológicas, conjuntamente, na tentativa de contribuir mais efetivamente com estratégias eficazes para melhorar as taxas de sobrevida e beneficiar maior número de pacientes portadores de osteossarcoma.



# Conclusão

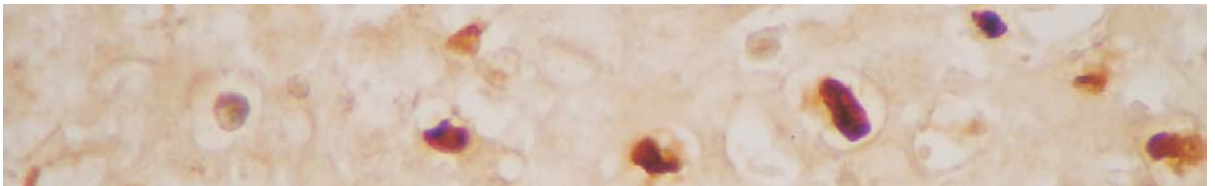


## 8 CONCLUSÃO

De acordo com a casuística, metodologia e resultados, foi possível concluir que:

- a) as variáveis, idade, sexo, tipo histológico e localização do tumor não apresentam associação com prognóstico;
- b) pacientes com tumores estágio III, cirurgia de amputação, abandono de tratamento e advento de complicações, sobretudo, recidiva local, são associados a mau prognóstico;
- c) grau de necrose apresenta associação estatisticamente significativa com prognóstico;
- d) houve ocorrência de apoptose e expressão da proteína p53 mutante nas fases iniciais do osteossarcoma, porém sem associação com prognóstico.

# Referências





## 9 REFERÊNCIAS\*

Asada N, Tsuchiya H, Tomita K. De novo deletions of p53 gene and wild-type p53 correlate with acquired cisplatin-resistance in human osteosarcoma OST cell line. *Anticancer Res.* 1999;19:5131-7.

Ayala AG, Czerniak B. Periosteal osteosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone.* Lyon: IARC; 2002. p.282-3.

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

Ayala AG, Ro JY, Raymond AK, Jaffe N, Chawla S, Carrasco H, et al. Small cell osteosarcoma: a clinical pathologic study of 27 cases. *Cancer.* 1989;64:2162-73.

Bacci G, Picci P, Orlandi M, Avella M, Manfrini M, Pignatti G, et al. Prognostic value of serum alkaline phosphatase in osteosarcoma. *Tumori.* 1987;73:331-6.

Bacci G, Picci P, Ferrari S, Orlandi M, Ruggieri P, Casadei R, et al. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase measurements in patients with osteosarcoma treated with adjuvant or neoadjuvant chemotherapy. *Cancer.* 1993;71:1224-30.

---

\* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the Internet]. Bethesda: U. S. National Library of Medicine; 2003 [last update 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). National Library of Medicine. List of journal indexed in Index Medicus. Washington;2003.

Bacci G, Mercuri M, Briccoli A, Ferrari S, Bertoni F, Donati D, et al. Osteogenic sarcoma of the extremity with detectable lung metastases at presentation. Results of treatment of 23 patients with chemotherapy followed by simultaneous resection of primary and metastatic lesions. *Cancer*. 1997;79:245-54.

Bacci G, Briccoli A, Mercuri M, Ferrari S, Bertoni F, Gasbarrini A, et al. Osteosarcoma of the extremities with synchronous lung metastases: long-term results in 44 patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *J Chemother*. 1998a;10:69-76.

Bacci G, Ferrari S, Delepine N, Bertoni F, Picci P, Mercuri M, et al. Predictive factors of histologic response to primary chemotherapy in osteosarcoma of the extremity: study of 272 patients preoperatively treated with high-dose methotrexate, doxorubicin, and cisplatin. *J Clinl Oncol*. 1998b;16:658-63.

Bacci G, Ferrari S, Mercuri M, Bertoni F, Picci P, Manfrini M, et al. Predictive factors for local recurrence in osteosarcoma: 540 patients with extremity tumors followed for minimum 2.5 years after neoadjuvant chemotherapy. *Acta Orthop Scand*. 1998c;69:230-6.

Bacci G, Briccoli A, Ferrari S, Saeter G, Donati D, Longhi A, et al. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with synchronous lung metastases: treatment with cisplatin, adriamycin and high dose of methotrexate and ifosfamide. *Oncol Rep*. 2000;7:339-46.

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

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

Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Picci P, Mercuri M, Alvegard TA, et al. High dose ifosfamide in combination with high dose methotrexate, adriamycin and cisplatin in the neoadjuvant treatment of extremity osteosarcoma: preliminary results of an Italian Sarcoma Group/Scandinavian Sarcoma Group pilot study. *J Chemother.* 2002b; 14:198-206.

Bacci G, Longhi A, Ferrari S, Lari S, Manfrini M, Donati D, et al. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase in osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: recent experience at Rizzoli Institute. *Oncol Rep.* 2002c;9:171-5.

Bacci G, Briccoli A, Rocca M, Ferrari S, Donati D, Longhi A, et al. Neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities with metastases at presentation: recent experience at the Rizzoli Institute in 57 patients treated with cisplatin, doxorubicin, and a high dose of methotrexate and ifosfamide. *Ann Oncol.* 2003;14:1126-38.

Bacci G, Longhi A, Ferrari S, Briccoli A, Donati D, De Paolis M, et al. Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase in osteosarcoma of the extremity: experience at Rizzoli on 1421 patients treated over the last 30 years. *Tumori.* 2004a;90:478-84.

Bacci G, Mercuri M, Longhi A, Setola E, Gozzi E, Forni C. Neoadjuvant chemotherapy for the treatment of osteosarcoma of the extremities: a comparison of results obtained in single-institution and multicenter trials. *Chir Organi Mov.* 2004b;9:283-92.

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

Bacci G, Longhi A, Fagioli F, Briccoli A, Versari M, Picci P. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremities: 27 year experience at Rizzoli Institute, Italy. *Eur J Cancer.* 2005b;41:2836-45.

Bacci G, Mercuri M, Longhi A, Ferrari S, Bertoni F, Versari M, et al. Grade of chemotherapy-induced necrosis as a predictor of local and systemic control in 881 patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremities treated with neoadjuvant chemotherapy in a single institution. *Eur J Cancer.* 2005c;41:2079-85.

Bacci G, Longhi A, Cesari M, Versari M, Bertoni F. Influence of local recurrence on survival in patients with extremity osteosarcoma treated with neoadjuvant chemotherapy: the experience of a single institution with 44 patients. *Cancer.* 2006a;106:2701-6.

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 a single institution. *Cancer.* 2006b;106:1154-61.

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



Basu A, DuBois G, Haldar S. Posttranslational modifications of Bcl2 family members: a potential therapeutic target for human malignancy. *Front Biosci.* 2006;11:1508-21.

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

Bertoni F, Present D, Bacchini P, Pignatti G, Picci P, Campanacci M. The Istituto Rizzoli experience with small cell osteosarcoma. *Cancer.* 1989;64:2591-9.

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

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

Blazquez S, Sirvent JJ, Olona M, Aguilar C, Pelegri A, Garcia JF, et al. Caspase-3 and caspase-6 in ductal breast carcinoma: a descriptive study. *Histol Histopathol.* 2006;21:1321-9.

Bodey B, Groger AM, Bodey Júnior B, Siegel SE, Kaiser HE. Immunohistochemical detection of p53 protein overexpression in primary human osteosarcomas. *Anticancer Res.* 1997;17:493-8.

- Bouchet BP, De Fromental CC, Puisieux A, Galmarini CM. p53 as a target for anti-cancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;58:190-207.
- Bramer JÁ, Abudu AA, Tillman RM, Carter SR, Sumathi VP, Grimer RJ. Pre- and post-chemotherapy alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in adults with localised osteosarcoma. *Eur J Cancer*. 2005;41:2846-52.
- Bykov VJN, Wiman KG. Novel cancer therapy by reactivation of the p53 apoptosis pathway. *Ann Med*. 2003;35:458-65.
- Bykov VJN, Zache N, Stridh H, Westman J, Bergman J, Selivanova G, et al. PRIMA-1(MET) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene*. 2005;24:3484-91.
- Camargo OP, Caiero MT. Reconstruções com endopróteses. *Clin Ortop*. 2002; 3:937-50.
- Chandar N, Billig B, McMaster J, Novak J. Inactivation of p53 gene in human and murine osteosarcoma cells. *Br J Cancer*. 1992;65:208-14.
- Chang F, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol*. 1995;13:1009-22.
- Clem RJ, Fecheimer M, Miler LK. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of infection cells. *Science*. 1991;254:1388-90.

Chybicka A, Jaworski W, Liebhart M, Golebiowski W, Kazanowska B, Weclawek-Tompol J, et al. [The analysis of failures in therapy of osteosarcoma in children treated according to SFOP-94 protocol in the studies of Polish pediatric solid tumors treatment group]. *Wiad Lek.* 1998; 51 (suppl 4):40-4.

Consentino E. Reconstrução esquelética com enxerto autólogo nas ressecções segmentares de tumores ósseos de alto grau de malignidade: soluções biológicas. *Clin Ortop.* 2002;3:919-28.

Croci AT. Reconstruções biológicas homólogas no tratamento dos tumores ósseos. *Clin Ortop.* 2002;3:929-36.

Damron TA, Ward WG, Stewart A. Osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma: National Cancer Data Base Report. *Clin Orthop.* 2007; 459:40-7.

Dan'ura T, Kawai A, Morimoto Y, Naito N, Yoshida A, Inoue H. Apoptosis and expression of its regulatory proteins in soft tissue sarcomas. *Cancer Lett.* 2002;178:167-74.

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

De Robertis EMF, Hib J. Morte celular. In: De Robertis EMF, Hib J. De Robertis: bases da biologia celular. 3<sup>rd</sup>.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.377-80.

Del Prever AB, Fagioli F, Berta M, Bertoni F, Ferrari S, Mercuri M. Long-term survival in high-grade axial osteosarcoma with bone and lung metastases treated with chemotherapy only. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2005;27:42-5.

Diller L, Kassel J, Nelson CE, Gryka MA, Litwak G, Gebhardt M, et al. p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol.* 1990;10:5772-81.

Dorfman HD, Czerniak B, Kotz R, Vanel D, Park YK, Unni KK. WHO classification of tumors of bone: introduction. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. *pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone.* Lyon: IARC; 2002. p.225-32.

Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, Karmolinski A, Dworakowski R, Wirth T, et al. Clinical significance of apoptotic index in non-small cell lung cancer: correlation with p53, mdm2, pRb and p21WAF1/CIP1 protein expression. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131:617-23.

Eckhardt S. Diagnóstico, estadiamento e princípio de tratamento. In: Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR, Bosh FX. *Manual de oncologia clínica.* 2.ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo; 1993. p.93-110.

Enneking WF. *Musculoskeletal tumor surgery.* New York: Churchill Livingstone; 1983. v.1.

Enneking WF, Kagan A. Skip metastases in osteosarcoma. *Cancer.* 1975;36:2192-205.

Entz-Werle N, Schneider A, Kalifa C, Voegeli AC, Tabone MD, Marec-Berard P, et al. Genetic alterations in primary osteosarcoma from 54 children and adolescents by targeted allelotyping. *Br J Cancer*. 2003;88:1925-31.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2005;37:719-27.

Fayette J, Blay JY. Genetic predictors for drug resistance in soft tissue sarcoma: a review of publications in 2004. *Curr Opin Oncol*. 2005;17:370-5.

Fechner RE, Mills SE. Tumors of the bones and joints. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1993. (Atlas of tumor pathology, n.8).

Ferguson WS, Goorin AM. Current treatment of osteosarcoma. *Cancer Invest*. 2001;19:292-315.

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

Ferrari S, Bertoni F, Zanella L, Setola E, Bacchini P, Alberghini M, et al. Evaluation of P-glycoprotein, HER-2/ErbB-2, p53, and Bcl-2 in primary tumor and metachronous lung metastases in patients with high-grade osteosarcoma. *Cancer*. 2004;100:1936-42.

- Ferrari S, Smeland S, Mercuri M, Bertoni F, Longhi A, Ruggieri P, et al. Neoadjuvant chemotherapy with high-dose Ifosfamide, high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for patients with localized osteosarcoma of the extremity: a joint study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. *J Clin Oncol.* 2005;23:8845-52.
- Fett-Conte AC, Salles, ABCF. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2002;24:85-9.
- Forest M, De Pinieux G, Knuutila S. Secondary osteosarcomas. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone.* Lyon: IARC; 2002. p.277-8.
- Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene.* 2003;22:9030-40.
- Fuchs B, Pritchard DJ. Etiology of osteosarcoma. *Clin Orthop.* 2002(397):40-52.
- Gajewska J, Abroszkiewicz J, Rychlowska-Pruszyńska M, Laskowska-Klita T. [Markers of bone formation in children with osteosarcoma]. *Med Wieku Rozwoj.* 2004;8:235-43.
- Garcia Filho RJ. Classificação e estadiamento dos tumores musculoesqueléticos. *Clin Ortop.* 2002a;3:681-98.
- Garcia Filho RJ. Tratamento cirúrgico dos tumores musculoesqueléticos: parte a: princípios e avaliação funcional das cirurgias de reconstrução dos membros acometidos por tumores. *Clin Ortop.* 2002b;3:883-98.

Garcia Filho, RJ. Tratamento cirúrgico dos tumores músculoesqueléticos: parte b: planejamento cirúrgico das ressecções. *Clin Orthop*. 2002c;3:887-98.

Gavrieli Y, Sherman YI, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992;119:493-501.

Ger LP, Wang JW, Lin CC, Wang J. Prognostic factors in 43 cases of osteosarcoma. *J Formos Med Assoc*. 1993;92:962-8.

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

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

Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control*. 2002;9:369-78.

Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat*. 1964;35:716-25.

Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*. 1965;7:247-54.

Gokgoz N, Wunder JS, Mousses S, Eskandarian S, Bell RS, Andrulis IL. Comparison of p53 mutations in patients with localized osteosarcoma and metastatic osteosarcoma. *Cancer*. 2001;92:2181-9.

- Goorin AM, Perez-Atayde A, Gebhardt M, Andersen JW, Wilkinson RH, Delorey MJ, et al. Weekly high-dose methotrexate and doxorubicin for osteosarcoma: the Dana-Farber Cancer Institute/the Children's Hospital: study III. *J Clin Oncol.* 1987;5:1178-84.
- Gorlick R, Huvos AG, Heller G, Aledo A, Beardsley GP, Healey JH, et al. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 1999;17:2781-8.
- Goto A, Kanda H, Ishikawa Y, Matsumoto S, Kawaguchi N, Machinami R, et al. Association of loss of heterozygosity at the p53 locus with chemoresistance in osteosarcomas. *Jpn J Cancer Res.* 1998;89:539-47.
- Grimer RJ, Taminiau AM, Cannon SR, Surgical Subcommittee of the European Osteosarcoma Intergroup. Surgical outcomes in osteosarcoma. *J Bone Joint Sur Br.* 2002;84:395-400.
- Grimer RJ, Cannon SR, Taminiau AM, Bielack S, Kempf-Bielack B, Windhager R, et al. Osteosarcoma over the age of forty. *Eur J Cancer.* 2003;39:157-63.
- Grotzer MA, Janss AJ, Fung KM, Sutton LN, Zhao H, Trojanowski JQ, et al. Abundance of apoptotic neoplastic cells in diagnostic biopsy samples is not a prognostic factor in childhood primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2001;23:25-9.
- Grundmann E, Roessner A, Ueda Y, Schneider-Stock R, Radig K. Current aspects of the pathology of osteosarcoma. *Anticancer Res.* 1995;15:1023-32.
- Guo W, Wang X, Feng C. P53 gene abnormalities in osteosarcoma. *Chin Med J.* 1996;109:752-5.



Hagedorn HG, Tubel J, Wiest I, Nerlich AG. In situ apoptotic and proliferation index in laryngeal squamous cell carcinomas. *Anal Cell Pathol.* 1998;16:177-84.

Ham SJ, Koops HS, Van Der Graaf WTA, Van Horn JR, Postma L, Hoestra HJ. Historical, current and future aspects of osteosarcoma treatment. *Eur J Surg Oncol.* 1998; 24:584-600.

Hansen M F. Molecular genetic considerations in osteosarcoma. *Clin Orthop.* 1991(270):237-46.

Hasegawa T, Hirose T, Seki K, Hizawa K, Ishii S, Wakabayashi J. Histological and immunohistochemical diversities, and proliferative activity and grading in osteosarcomas. *Cancer Detect Prev.* 1997;21:280-7.

Haslam RH, Lamborn KR, Becker LE, Israel MA. Tumor cell apoptosis present at diagnosis may predict treatment outcome for patients with medulloblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1998;20:520-7.

Heare TC, Enneking WF, Heare MM. Técnicas e estadiamento e biópsia dos tumores ósseos. *Clin Ortop Am Norte.* 1989;20: 275-87.

Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, et al. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 3551-5.

Hornicek FJ, Gebhardt MC, Wolfe MW, Kharrazi FD, Takeshita H, Parekh SG, et al. P-glycoprotein levels predict poor outcome in patients with osteosarcoma. *Clin Orthop.* 2000(373):11-7.

Horta MF, Young JD. Quando a célula programa a própria morte. *Ciênc Hoje*. 1999;25(150):38-45.

Howard SC, Ortiz R, Baez LF, Cabanas R, Barrantes J, Fu L, et al. Protocol-based treatment for children with cancer in low income countries in Latin America: a report on the recent meetings of the Monza International School of Pediatric Hematology/Oncology (MISPHO): part II. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48:486-90.

HUGO Gene Nomenclature Committee. [updated March 2007]; cited 26 Apr 2008. Available from: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature>.

Hung J, Anderson R. p53: functions, mutations and sarcomas. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1997;273:68-73.

Huvos AG. Osteogenic sarcoma of bones and soft tissues in older persons: a clinicopathologic analysis of 117 patients older than 60 years. *Cancer*. 1986;57:1442-9.

Huvos AG. Osteogenic sarcoma. In: Huvos AG. *Bone tumors: diagnosis, treatment and prognosis*. 2<sup>nd</sup>.ed. Philadelphia: Saunders; 1991. p.85-155.

Huvos AG, Rosen G, Marcove RC. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy, en block resection and prosthetic bone replacement. *Arch Pathol Lab Med*. 1977;102:14-8.

Jaffe N, Carrasco H, Raymond K, Ayala A, Eftekhari F. Can cure in patients with osteosarcoma be achieved exclusively with chemotherapy and abrogation of surgery? *Cancer*. 2002;95:2202-10.

Jia L, Esguerra RL, Tang X, Yin H, Sakamoto K, Okada N, et al. Prognostic value of apoptosis and apoptosis-associated proteins in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Pathol Int.* 2004;54:217-23.

Jordão BQ, Andrade CGTJ. Apoptose. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular.* 7<sup>th</sup>.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 191.

Kager L, Zoubek A, Potechger U, Kastner U, Flege S, Kempf-Bielack B, et al. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol.* 2003;21:2011-8.

Kager L, Zoubek A, Kastner U, Kempf-Bielack B, Potratz J, Kotz R. Skip metastases in osteosarcoma: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2006;24:1535-41.

Kakar S, Mihalov M, Chachlani NA, Ghosh L. Correlation of c-fos, p53, and PCNA expression with treatment outcome in osteosarcoma. *J Surg Oncol.* 2000;73:125-6

Kalil R, Bridge JA. Small cell osteosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone.* Lyon: IARC; 2002. p.273-4.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assoc.* 1958;53:457-81.

Kasagi N, Gomyo Y, Shirai H, Tsujitani S, Ito H. Apoptotic cell death in human gastric carcinoma: analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. *Jpn J Cancer Res.* 1994;85:939-45.

Kaste SC, Pratt CB, Cain AM, Jones-Wallace DJ, Rao BN. Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis: imaging features. *Cancer*. 1999;86:1602-8.

Kaste SC, Liu T, Billups CA, Daw NC, Pratt CB, Meyer WH. Tumor size as a predictor of outcome in pediatric non-metastatic osteosarcoma of the extremity. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;43:723-8.

Kawauchi S, Fukuda T, Oda Y, Saito T, Oga A, Takeshita M, et al. Prognostic significance of apoptosis in synovial sarcoma: correlation with clinicopathologic parameters, cell proliferative activity, and expression of apoptosis-related proteins. *Mod Pathol*. 2000;13:755-65.

Kawaguchi K, Oda Y, Sakamoto A, Saito T, Tamiya S, Iwamoto Y, et al. Molecular analysis of p53, MDM2, and H-ras genes in osteosarcoma and malignant fibrous histiocytoma of bone in patients older than 40 years. *Mod Pathol*. 2002;15:878-8.

Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284:C1309-18.

Klein MJ, Kenam S, Lewis MN. Osteosarcoma considerações clínicas e patológicas. *Clin Ortop Am Norte*. 1989;20:329-48.

Klumb CE, Cavalcanti Júnior GB. Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2002;24:111-25.

Korshunov A, Golanov A, Ozerov S, Sycheva R. Prognostic value of tumor-associated antigens immunoreactivity and apoptosis in medulloblastomas: an analysis of 73 cases. *Brain Tumor Pathol.* 1999;16:37-44.

Kubista B, Erovic BM, Klinger H, Sulzbacher I, Trieb K. CD9 expression is not a prognostic factor in human osteosarcoma. *Cancer Lett.* 2004;209:105-10.

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

Lane JM, Urson B, Boland PJ, Glasser DB. Osteogenic sarcoma. *Clin Orthop.* 1986;204:93-110.

Lara PC, Perez S, Rey A, Santana C. Apoptosis in carcinoma of the bladder: relation with radiation treatment results. *Int J Rad Oncol Biol Phys.* 1999;43:1015-9.

Leavey PJ, Day MD, Booth T, Maale G. Skip metastasis in osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25:806-8.

Lee SH, Oh JH, Lee KS, Yoo KH, Kim HS. Infection after prosthetic reconstruction in limb salvage surgery. *Int Orthop.* 2002;26:179-84.

Link MP, Goorin AM, Horowitz M, Meyer WH, Belasco J, Baker A, et al. Adjuvant chemotherapy of high-grade osteosarcoma of the extremity: updated results of the Multi-Institutional Osteosarcoma Study. *Clin Orthop.* 1991(270):8-14.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Morte celular e sua regulação. In: Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Biologia celular e molecular*. 4.ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p.1044-53.

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

Louro ID. Apoptose. In: Louro ID, Rocha JCC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Conforti-Froes ND. *Genética molecular do cancer*. 2.ed. São Paulo: MSG; 2002. p.91-100.

Lopes A, Nakagawa WT, Mello CAL. Oncogenes e genes supressores de tumor: um equilíbrio necessário. In: Rossi BM, Pinho M. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo: Lemar; 1999. p.125-42.

Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*. 1994;266:807-10.

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

McDonald DJ, Capanna R, Gherlinzoni F, Bacci G, Ferruzzi A, Casadei R, et al. Influence of chemotherapy on perioperative complications in limb salvage surgery for bone tumors. *Cancer*. 1990;65:1509-16.

McIntyre JF, Smith-Sorensen B, Friend SH, Kassell J, Borresen AL, Yan YX, et al. Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma. *J Clin Oncol.* 1994;12:925-30.

McTiernan A, Meyer T, Michelagnoli MP, Lewis I, Whelan JS. A phase I/II study of doxorubicin, ifosfamide, etoposide and interval methotrexate in patients with poor prognosis osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2006;46:345-50.

Maeda A, Nakamura S, Isono M, Osaki M, Ito H, Sato K. Induction of efficient apoptosis and cell-cycle arrest in tumor cells by adenovirus-mediated p53 A4 mutant. *Pathol Int.* 2006;56:126-34.

Magistrelli P, Coppola R, Tonini G, Vincenzi B, Santini D, Borzomati D, et al. Apoptotic index or a combination of Bax/Bcl-2 expression correlate with survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *J Cell Biochem.* 2006;97:98-108.

Malawer MM, Link MP, Donaldson SS. Sarcomas of bone. In: DeVita Júnior VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles and practice of oncology.* Philadelphia: J. B. Lippincott; 1989. p.1418-68.

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

Mankin HJ, Hornicek FJ, Rosenberg AE, Harmon DC, Gebhardt MC. Survival data for 648 patients with osteosarcoma treated at one institution. *Clin Orthop.* 2004, 429:286-291.

- 
- Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *Oncologist*. 2004;9:422-41.
- Marina MN, Pratt CB, Rao BN, Ahema SJ, Meyer WH. Improved prognosis of children with osteosarcoma metastatic to the lung (s) at the time of diagnosis. *Cancer*. 1992;70:2722-7.
- Matsuo T, Sugita T, Sato K, Hotta T, Tsuchiya H, Shimose S, et al. Clinical outcomes of 54 pelvic osteosarcomas registered by Japanese musculoskeletal oncology group. *Oncology*. 2005;68:375-81.
- Merimsky O, Kollender Y, Issakov J, Inbar M, Flusser G, Benayahu D, et al. Induction chemotherapy for bone sarcoma in adults: correlation of results with erbB-4 expression. *Oncol Rep*. 2003;10:1593-9.
- Meyn MS. Ataxia-teleangectasia and cellular responses to DNA damage. *Cancer Res*. 1995;55:5991-6001.
- Meyers PA, Heller G, Really J, Huvos A, Lane J, Markov R, et al. Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol*. 1992;10:5-15.
- Meyers PA, Heller G, Healey JH, Huvos A, Applewhite A, Sun M, et al. Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation. *J Clin Oncol*. 1993;11:449-53.
- Mialou V, Philip T, Kalifa C, Perol D, Gentet JC, Marec-Berard P, et al. Metastatic osteosarcoma at diagnosis: prognostic factors and long-term outcome: the French pediatric experience. *Cancer*. 2005;104:1100-9.



Miller CW, Aslo A, Tsay C, Slamon D, Ishizaki K, Toguchida J, et al. Frequency and structure of p53 rearrangements in human osteosarcoma. *Cancer Res.* 1990;50:7950-4.

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

Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of human bax gene. *Cell.* 1995;80:293-9.

Mousses S, McAuley L, Bell RS, Kandel R, Andrulis IL. Molecular and immunohistochemical identification of p53 alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Mod Pathol.* 1996;9:1-6.

Nakayama T, Toguchida J, Wadayama B, Kanoe H, Kotoura Y, Sasaki MS. MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with tumor progression in differentiated adipose-tissue tumors. *Int J Cancer.* 1995;64:342-6.

Oda Y, Naka T, Takeshita M, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Comparison of histological changes and changes in nm23 and c-MET expression between primary and metastatic sites in osteosarcoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 2000;31:709-16.

Ohashi K, Nemoto T, Eishi Y, Matsuno A, Nakamura K, Hirokawa K. Proliferative activity and p53 protein accumulation correlate with early invasive trend, and apoptosis correlates with differentiation grade in oesophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch.* 1997;430:107-15.

Okada K, Frassica FJ, Sim FH, Beabout JW, Bond JR, Unni KK. Parosteal osteosarcoma: a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76:366-78.

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

Pakos EE, Ioannidis JP. The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma: a meta-analysis. *Cancer.* 2003;98:581-9.

Pakos EE, Kyzas PA, Ioannidis JPA. Prognostic significance of tp53 tumor suppressor gene expression and mutations in human osteosarcoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6208-14.

Papai Z, Féja CN, Hanna EN, Sztán M, Oláh E, Szendroi M. P53 overexpression as an indicator of overall survival and response to treatment in osteosarcomas. *Pathol Oncol Res.* 1997;13:15-9.

Park YB, Kim HS, Oh JH, Lee SH. The co-expression of p53 protein and P-glycoprotein is correlated to a poor prognosis in osteosarcoma. *Int Orthop.* 2001;24:307-10.

Park HR, Jung WW, Bertoni F, Bacchini P, Park JH, Kim YW, et al. Molecular analysis of p53, MDM2 and H-ras genes in low-grade central osteosarcoma. *Pathol Res Pract.* 2004;200:439-45.

Parolin MB, Reason IJM. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq Gastroenterol.* 2001;38:134-44.

Patiño-García A, Ariznabarreta SL. [Molecular analysis of tumor suppressor genes p16INK4 and TP53 of osteosarcomas in Spanish children]. *An Esp Pediatr.* 1997;47:478-82.

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

Pereira KS, Zuccari DAPC, Cury PM, Cordeiro JÁ. A apoptose como marcador prognóstico em tumores mamários caninos pelo método TUNEL. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2003;40:359-5.

Petrilli AS. Osteossarcoma: quimioterapia intra-arterial e fatores prognósticos [Thesis - doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1988.

Petrilli AS. Experiência brasileira em osteossarcoma: fatores prognósticos e impacto na sobrevida [Thesis - Livre-docência]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 2005.

Petrilli AS, Gentil FC, Epelman S, Lopes LF, Bianchi A, Lopes A, et al. Increased survival, limb preservation and prognostic factors of osteosarcoma. *Cancer.* 1991;68:733-7.

Petrilli AS, De Camargo B, Odone Filho V, Bruniera P, Brunetto AL, Jesus-Garcia R, et al. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol.* 2006;24:1161-8.

- Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, Cawley JC, Taylor AM, Stankovic T. p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to *TP53* mutation. *Blood*. 2001;98:814-22.
- Picci P, Bacci G, Campanacci M, Gasparini M, Pilotti S, Cerasoli S, et al. Histologic evaluation of necrosis in osteosarcoma induced by chemotherapy. Regional mapping of viable and nonviable tumor. *Cancer*. 1985;56:1515-21.
- Picci P, Sangiorgi L, Rougraff BT, Neff JR, Casadei R, Campanacci M. Relationship of chemotherapy-induced necrosis and surgical margins to local recurrence in osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1994;12:2699-705.
- Picci P, Sangiorgi L, Bahamonde L, Aluigi P, Bibiloni J, Zavatta M, et al. Risk factors for local recurrences after limb-salvage surgery for high-grade osteosarcoma of the extremities. *Ann Oncol*. 1997;8:899-903.
- Pinho MSL. Proteína p53: algum valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da literatura. *Rev Bras Coloproct*. 2000;20:258-60.
- Pochanugool L, Subhadharaphandou T, Dhanachai M, Hathirat P, Sangthawan D, Pirabul R, et al. Prognostic factors among 130 patients with osteosarcoma. *Clin Orthop*. 1997(345):206-14.
- Pompetti F, Rizzo P, Simon RM, Freidlin B, Mew DJ, Pass HI, et al. Oncogene alterations in primary, recurrent, and metastatic human bone tumors. *J Cell Biochem*. 1996;63:37-50.
- Pompetti F, Stuppia L, Gatta V, Calabrese G, Gamberi G, Benassi MS, et al. Correlation between apoptosis and TP53 status in osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998;105:177-81.

Porter DE, Holden ST, Steel CM, Cohen BB, Wallace MR, Reid R. A significant proportion of patients with osteosarcoma may belong to Li-Fraumeni cancer families. *J Bone Joint Surg Br.* 1992;74:883-6.

Provisor AJ, Ettinger LJ, Nachman JB, Krailo MD, Makley JT, Yunis EJ, et al. Treatment of nonmetastatic osteosarcoma of the extremity with preoperative and postoperative chemotherapy: a report from the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol.* 1997;1:76-84.

Radig K, Schneider-Stock R, Haeckel C, Neumann W, Roessner A. p53 gene mutations in osteosarcomas of low-grade malignancy. *Hum Pathol.* 1998;29:1310-6.

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

Raymond AK, Ayala AG, Knuutila S. Conventional osteosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone.* Lyon: IARC; 2002. p.264-72.

Rech A, Castro Júnior CG, Mattei J, Gregianin L, Di Leone L, David A, et al. Clinical features in osteosarcoma and prognostic implications. *J Pediatr (Rio J).* 2004;80:65-70.

Ribeiro Júnior U, Safatle-Ribeiro AV. p53 na prática clínica: sim ou não? *Arq Gastroenterol.* 2006;43:6-7.

Ribeiro Júnior U, Alves VA, Souza PMSB, Safatle-Ribeiro AV, Rawet V, Nonogaki S, et al. Correlação das proteínas p53 e Ki67 com o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma de reto distal. *Rev Bras Coloproctol*. 2000;20:248-56.

Rodriguez-Galindo C, Shah N, McCarville MB, Billups CA, Neel MN, Rao BN, et al. Outcome after local recurrence of osteosarcoma: the St. Jude Children's Research Hospital experience (1970-2000). *Cancer*. 2004;100:1928-35.

Rosen G, Murphy ML, Huvos AG, Gutierrez M, Marcove RC. Chemotherapy, en block resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer*. 1976;37:1-11.

Rosen G, Marcove RC, Caparros B, Nirenberg A, Kosloff C, Huvos AG. Primary osteogenic sarcoma: the rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer*. 1979;43:2163-77.

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

Rytting M, Pearson P, Raymond AK, Ayala A, Murray J, Yasko AW, et al. Osteosarcoma in preadolescent patients. *Clin Orthop*. 2000(373):39-50.

Rytwinski K, Wnuk A, Wozniak W, Rychlowska M, Bienkowska M. [Assessment of the correlation between proliferation defined by S-phase cell cycle and apoptosis after preoperative chemotherapy in osteosarcomas of children and adolescents]. *Med Wieku Rozwoj*. 2004;8:1029-36.

Saab R, Rao BN, Rodriguez-Galindo C, Billups CA, Fortenberry TN, Daw NC. Osteosarcoma of the pelvis in children and young adults: the St. Jude Children's Research Hospital experience. *Cancer*. 2005;103:1468-74.

Saeter G, Eloma I, Wahlqvist Y, Alvegard TA, Wieber T, Monge O, et al. Prognostic factores in bone sarcomas. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1997;68:156-60.

Sagol O, Yavuzsen T, Oztop I, Ulukus C, Ylmaz U, Alakavuklar M, et al. The effect of apoptotic activity, survivin, Ki-67, and P-glycoprotein expression on prognosis in pancreatic carcinoma. *Pancreas*. 2005;30:343-8.

Saini KS, Walker NI. Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 1998;178:9-25.

Sajadi KR, Heck RK, Neel MD, Rao BN, Daw N, Rodriguez-Galindo C, et al. The incidence and prognosis of osteosarcoma skip metastases. *Clin Orthop*. 2004(426):92-6.

Sameshima S, Kubota Y, Sawada T, Watanabe T, Kuroda L, Tsuno N, et al. Overexpression of p53 protein and histologic grades of dysplasia in colorectal adenomas. *Dis Colon Rectum*. 1996;39:562-7.

Schajowicz F. Tumores de huesos y articulaciones: malignos. In: Schajowicz F. Tumores y lesiones seudotumorales de huesos y articulaciones. Buenos Aires: Panamericana; 1982. p.72-119.

Schajowics F. Histological typing of bone. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer; 1993.

Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*. 1993;14:133-51.

Scranton Júnior PE, De Cicco FA, Totten RS, Yunis EJ. Prognostic factors in osteosarcoma: a review of 20 year's experience at the University of Pittsburgh Health. *Cancer*. 1975;36:2179-91.

Scully SP, Temple HT, O'Keefe RJ, Mankin HJ, Gebhardt M. The surgical treatment of patients with osteosarcoma who sustain a pathologic fracture. *Clin Orthop*. 1996(324):227-32.

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

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

Serra M, Scotlandi K, Reverter-Branchat G, Ferrari S, Manara MC, Benini S, et al. Value of P-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities. *J Clin Oncol*. 2003;21:536-42.

Shibakita M, Tachibana M, Dhar DK, Ohno S, Kubota H, Yoshimura H, et al. Spontaneous apoptosis in advanced esophageal carcinoma: its relation to Fas expression. *Clin Cancer Res*. 2000;6:4755-9.

Shibata H, Matsubara O. Apoptosis as an independent prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Int*. 2001;51:498-503

Sim FH, Unni KK, Beabout JW, Dahlin DC. Osteosarcoma with small cell simulating Ewing's tumor. *J Bone Joint Surg Am*. 1979;61:207-15.



Simon R. Clinical prognostic factors in osteosarcoma. *Cancer Treat Rep.* 1978;62:193-7.

Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Can Res.* 2005;11:3974-86.

Soussi T. The p53 pathway and human cancer. *Br J Surg.* 2005;92:1331-2.

Strauss PG, Mitreiter K, Zitzelsberger H, Luz A, Schmidt J, Erfle V, et al. Elevated p53 RNA expression correlates with incomplete osteogenic differentiation of radiation-induced murine osteosarcomas. *Int J Cancer.* 1992;50:252-8.

Sugamura K, Makino M, Kaibara N. Apoptosis as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Surg Today.* 1998;28:145-50.

Szendroi M, Papai Z, Koos R, Illes T. Limb-saving surgery, survival, and prognostic factors for osteosarcoma: the Hungarian experience. *J Surg Oncol.* 2000;73:87-94.

Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kuhn R, Wittekind CW. Incidence of apoptosis, cell proliferation and P53 expression in renal cell carcinomas. *Anticancer Res.* 1997;17:1155-62.

Taylor WF, Ivins JC, Pritchard DJ, Dahlin DC, Gilchrist GS, Edmonson JH. Trends and variability in survival among patients with osteosarcoma: a 7-year update. *Mayo Clin Proc.* 1985;2:91-104.

Tobias JD, Pratt CB, Parham DM, Green AA, Rao B. The significance of calcified regional lymph nodes at the time of diagnosis of osteosarcoma. *Orthopedics*. 1985;8:49-52.

Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B, Beauchamp RL, Dayton SH, Herrera GE, et al. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Res*. 1992;52:6194-9.

Tomer G, Kidron D, Katz K, Yosipovitch Z, Meller I, Zaizov R. Prognostic factors in non-metastatic limb osteosarcoma: a 20-year experience of one center. *Int J Oncol*. 1999;15:179-85.

Trieb K, Kotz R. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33:11-7.

Tsang WP, Chau SP, Fung KP, Kong SK, Kwok TT. Modulation of multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) by p53 mutant in Saos-2 cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003;51:161-6.

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.

Uchibori M, Nishida Y, Nagasaka T, Yamada Y, Nakanishi K, Ishiguro N. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 is correlated with poor prognosis in patients with osteosarcoma. *Int J Oncol*. 2006;28:33-42.

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

Uni KK, Knuutila S. Parosteal osteosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone.* Lyon: IARC; 2002. p.279-81.

Uozaki H, Ishida T, Kakiuchi C, Horiuchi H, Gotoh T, Iijima T, et al. Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis. *Pathol Res Pract.* 2000;196:665-73.

Uribe-Botero G, Russell WO, Sutow WW, Martin RG. Primary osteosarcoma of bone. Clinicopathologic investigation of 243 cases, with necropsy studies in 54. *Am J Clin Pathol.* 1977;67:427-35.

Vakkala M, Lahteenmaki K, Raunio H, Paakko P, Soini Y. Apoptosis during breast carcinoma progression. *Clin Cancer Res.* 1999;5:319-24.

Varan A, Yazici N, Aksoy C, Gedikolu G, Yalcin B, Akyuz C, et al. Treatment results of pediatric osteosarcoma: twenty-year experience. *J Pediatr Orthop.* 2007;27:241-6.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2002;408:307-10.

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

Yamaguchi K, Sugano K, Fukayama N, Nakashima Y, Saotome K, Yokoyama T, et al. Polymerase chain reaction- based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. *Am J Gastroenterol.* 1997;92:307-12.

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

Wadayama B, Toguchida J, Yamaguchi T, Sasaki MS, Yamamuro T. p53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Br J Cancer.* 1993;68:1134-9.

Wang LL. Biology of osteogenic sarcoma. *Cancer J.* 2005;11:294-305.

Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem.* 1993;41:7-12.

Wirganowicz PZ, Eckardt JJ, Dorey FJ, Eilber FR, Kabo JM. Etiology and results of tumor endoprosthesis revision surgery in 64 patients. *Clin Orthop.* 1999(358):64-74.

Wold WO, Wold LE, Unni KK, Beabout JW, Pritchard DJ. High-grade surface osteosarcomas. *Am J Surg Pathol.* 1984;8:181-6.

Wold L, McCarthy E, Knuutila S. High grade surface osteosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone.* Lyon: IARC; 2002. p.284-5.

Wuisman P, Enneking WF. [Staging of osteosarcoma with skip metastases]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1990;128:457-62.

Wu X, Chen ZR, Zhang GJ. [Apoptosis-related gene expression and its clinical significance of human osteosarcoma]. *Chung-Hua Chung Liu Tsa Chih.* 2004;26:678-81.

Wunder JS, Bull SB, Aneliunas V, Lee PD, Davis AM, Beauchamp CP, et al. MDR1 Gene expression and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. *J Clin Oncol.* 2000;18:2685-94.

Wunder JS, Gokgoz N, Parkes R, Bull SB, Eskandarian S, Davis AM, et al. TP53 Mutations and outcome in osteosarcoma: a prospective, multicenter study. *J Clin Oncol.* 2005;23:1483-90.

Zaghloul MS, El Naggar M, El Deeb A, Khaled H, Mokhtar N. Prognostic implication of apoptosis and angiogenesis in cervical uteri cancer. *Int Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;48:1409-15.

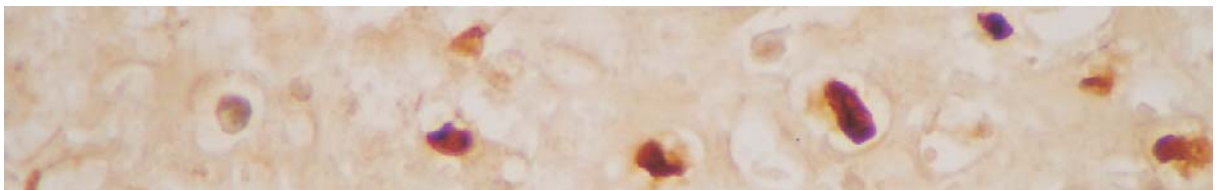
Zhou H, Randall RL, Brothman AR, Maxwell T, Coffin CM, Goldsby RE. Her-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25:27-32.

Zhu JJ, Li FB, Zhu XF, Liao WM. The p33ING1b tumor suppressor cooperates with p53 to induce apoptosis in response to etoposide in human osteosarcoma cells. *Life Sci.* 2006;78:1469-77.

Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ.* 2006;13:1351-9.

Zunino JH, Johnston JO. Prognostic value of histologic tumor necrosis assessment in osteogenic sarcoma of bone. *Am J Orthop.* 2000;29: 369-72.

# Apêndice



**Quadro 6 – Características da casuística estudada (casos 1 a 34)**

Caso	Sexo	Idade	Localização tumor	Classificação	Classificação	Classificação	Estádio Clínico	Tratamento	Eventos pré tratamento	
1	M	6	fêmur diafisário	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
2	M	20	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
3	F	9	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	incompleto	nenhum	
4	F	15	tíbia P	primário	central	condroblástico	II B	completo	nenhum	
5	F	24	fíbula D	primário	central	telangectásico	II B	incompleto	nenhum	
6	F	10	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
7	M	19	fêmur D	primário	central	pequenas células	II B	incompleto	nenhum	
8	F	29	úmero P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
9	M	14	úmero P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
10	M	19	fêmur P	primário	central	condroblástico	II B	incompleto	nenhum	
11	F	15	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
12	F	43	tíbia diafisária	secundário	rádio induzido	condroblástico	II B	incompleto	Qt em outro serviço	
13	M	16	fíbula P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
14	M	16	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
15	F	20	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
16	M	15	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
17	M	20	fíbula P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
18	F	28	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
19	M	6	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
20	F	15	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	incompleto	nenhum	
21	M	23	fêmur D	primário	central	osteoblástico	III B	completo	nenhum	
22	M	20	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
23	M	27	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
24	M	14	fíbula P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
25	M	22	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
26	M	17	tíbia P	primário	central	telangectásico	II B	incompleto	nenhum	
27	F	23	úmero P	primário	central	condroblástico	II B	completo	nenhum	
28	M	16	fêmur D	primário	central	fibroblástico	III B	completo	nenhum	
29	F	35	fêmur P	secundário	rádio induzido	periférico paraostal	osteoblástico	I A	completo	nenhum
30	M	16	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
31	F	21	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	
32	F	25	fêmur diafisário	primário	central	condroblástico	II B	incompleto	tumor curetado	
33	M	15	tíbia P	primário	central	condroblástico	II B	completo	nenhum	
34	F	19	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum	

P = Proximal; D = Distal; M = Masculino; F = Feminino; Qt = Quimioterapia



Quadro 7 – Características da casuística estudada (casos 35 a 69)

Caso	Sexo	Idade	Localização tumor	Classificação	Classificação	Classificação	Estádio Clínico	Tratamento	Eventos pré tratamento
35	F	20	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
36	F	31	fêmur P	primário	periférico periostal	condroblástico	II A	completo	nenhum
37	M	16	tíbia P	primário	central	condroblástico	II B	completo	nenhum
38	F	14	fêmur D	primário	central	telangectásico	II B	completo	nenhum
39	M	8	úmero P	primário	central	fibroblástico	II B	completo	nenhum
40	M	18	úmero P	primário	central	osteoblástico	III B	completo	nenhum
41	M	17	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
42	M	15	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	Qt em outro serviço
43	M	19	tíbia P	primário	central	fibroblástico	II B	completo	nenhum
44	M	17	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
45	M	14	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
46	F	19	úmero P	primário	central	fibroblástico	II B	completo	nenhum
47	M	18	fêmur D	primário	central	osteoblástico	III B	completo	nenhum
48	F	12	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
49	M	21	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
50	M	15	tíbia D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
51	M	20	fêmur D	primário	central	osteoblástico	III B	completo	nenhum
52	F	12	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
53	M	16	tíbia P	primário	central	condroblástico	III B	completo	tratado como osteomielite
54	F	26	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
55	F	13	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
56	F	17	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
57	M	34	tíbia P	primário	central	condroblástico	II B	completo	nenhum
58	M	10	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
59	M	41	tíbia diafisária	primário	periférico periostal	condroblástico	II A	completo	nenhum
60	M	14	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
61	M	9	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	incompleto	nenhum
62	M	25	ísquio púbico	primário	central	osteoblástico	II B	incompleto	nenhum
63	F	6	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
64	M	24	úmero D	primário	central	fibroblástico	II B	completo	nenhum
65	F	17	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	incompleto	nenhum
66	M	13	fêmur D	primário	central	osteoblástico	II B	incompleto	nenhum
67	F	12	tíbia P	primário	central	osteoblástico	III B	incompleto	nenhum
68	F	39	tíbia P	primário	central	osteoblástico	II B	completo	nenhum
69	M	38	fíbula D	primário	periférico paraostal	osteoblástico	I A	completo	nenhum

P = Proximal; D = Distal; M = Masculino; F = Feminino; Qt = Quimioterapia

Quadro 8 – Características da casuística estudada (casos 1 a 34)

Caso	Qt	Cirurgia	Grau de Necrose	Complicações	Evolução Clínica	Sobrevida	p53	Índice de apoptose (%)
1	III	conservadora	IV	nenhuma	vivo	43	positivo	2
2	III	conservadora	III	nenhuma	vivo	49	material insuficiente	material insuficiente
3	III	amputação	I	nenhuma	morto	7	negativo	32
4	III	conservadora	III	infecção	vivo	60	negativo	negativo
5	III	não realizada	0	nenhuma	morto	10	positivo	negativo
6	III	conservadora	III	nenhuma	vivo	63	positivo	negativo
7	III	não realizada	0	nenhuma	morto	10	negativo	negativo
8	III	conservadora	II	nenhuma	vivo	64	positivo	negativo
9	III	amputação	III	nenhuma	vivo	59	positivo	3
10	III	conservadora	III	septicemia	morto	11	negativo	2
11	III	conservadora	II	recidiva	morto	25	negativo	25
12	III	amputação	0	nenhuma	morto	12	material insuficiente	material insuficiente
13	III	conservadora	III	nenhuma	vivo	62	negativo	negativo
14	III	conservadora	III	recidiva	morto	47	negativo	negativo
15	III	conservadora	II	nenhuma	vivo	78	negativo	negativo
16	I	amputação	II	nenhuma	morto	25	negativo	negativo
17	I	amputação	0	nenhuma	morto	40	negativo	negativo
18	III	conservadora	I	recidiva	morto	13	positivo	negativo
19	III	amputação	II	nenhuma	morto	51	negativo	negativo
20	III	não realizada	0	nenhuma	morto	7	negativo	negativo
21	III	conservadora	I	nenhuma	morto	21	positivo	19
22	III	conservadora	II	nenhuma	vivo	80	negativo	6
23	III	conservadora	II	nenhuma	morto	17	material insuficiente	material insuficiente
24	II	amputação	II	nenhuma	morto	16	negativo	22
25	I	conservadora	IV	nenhuma	vivo	171	positivo	14
26	I	conservadora	I	recidiva	morto	10	sem bloco	sem bloco
27	III	conservadora	III	nenhuma	vivo	52	negativo	7
28	III	conservadora	III	nenhuma	morto	14	negativo	negativo
29	0	conservadora	0	nenhuma	vivo	83	material insuficiente	material insuficiente
30	II	conservadora	III	nenhuma	morto	72	positivo	negativo
31	III	conservadora	IV	infecção	vivo	53	positivo	negativo
32	III	amputação	0	nenhuma	morto	8	sem bloco	sem bloco
33	I	conservadora	III	infecção	morto	20	positivo	28
34	III	conservadora	I	recidiva	morto	15	positivo	negativo

Qt = protocolo de quimioterapia; 0 = não realizado

Quadro 9 – Características da casuística estudada (casos 35 a 69)

Caso	Qt	Cirurgia	Grau de Necrose	Complicações	Evolução Clínica	Sobrevida	p53	Índice de apoptose (%)
35	III	conservadora	IV	nenhuma	morto	43	sem bloco	sem bloco
36	I	conservadora	II	nenhuma	morto	63	positivo	18
37	I	conservadora	III	nenhuma	morto	93	positivo	8
38	I	conservadora	III	nenhuma	vivo	132	negativo	negativo
39	I	conservadora	III	nenhuma	vivo	171	material insuficiente	material insuficiente
40	III	amputação	I	nenhuma	morto	12	negativo	2
41	I	conservadora	III	nenhuma	morto	19	positivo	12
42	III	conservadora	II	nenhuma	morto	32	positivo	30
43	III	conservadora	IV	nenhuma	vivo	160	sem bloco	sem bloco
44	I	amputação	II	nenhuma	morto	32	negativo	2
45	I	conservadora	II	nenhuma	vivo	183	negativo	25
46	III	conservadora	III	nenhuma	vivo	117	negativo	negativo
47	III	amputação	III	nenhuma	vivo	65	negativo	7
48	III	conservadora	II	nenhuma	vivo	51	positivo	27
49	III	conservadora	III	infecção	morto	35	positivo	4
50	III	amputação	II	nenhuma	vivo	54	negativo	negativo
51	III	não realizada	0	nenhuma	morto	10	negativo	negativo
52	I	amputação	I	nenhuma	morto	24	sem bloco	sem bloco
53	III	amputação	I	recidiva	morto	18	positivo	2
54	III	amputação	I	nenhuma	morto	23	negativo	12
55	III	conservadora	III	nenhuma	vivo	73	positivo	28
56	III	conservadora	II	nenhuma	morto	64	negativo	negativo
57	III	conservadora	II	nenhuma	vivo	76	positivo	4
58	III	amputação	I	nenhuma	morto	17	positivo	2
59	III	conservadora	IV	nenhuma	vivo	47	sem bloco	sem bloco
60	III	conservadora	III	nenhuma	vivo	61	sem bloco	sem bloco
61	III	amputação	I	nenhuma	morto	10	material insuficiente	material insuficiente
62	III	não realizada	0	nenhuma	morto	14	positivo	negativo
63	IV	conservadora	IV	nenhuma	vivo	33	negativo	5
64	III	conservadora	IV	nenhuma	vivo	31	sem bloco	sem bloco
65	IV	não realizada	0	septcemia	morto	3	sem bloco	sem bloco
66	IV	conservadora	IV	septcemia	morto	8	negativo	negativo
67	IV	conservadora	IV	septcemia	morto	5	negativo	36
68	III	amputação	III	nenhuma	vivo	25	material insuficiente	material insuficiente
69	0	conservadora	0	nenhuma	vivo	19	negativo	4

Qt = protocolo de quimioterapia; 0 = não realizado

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)