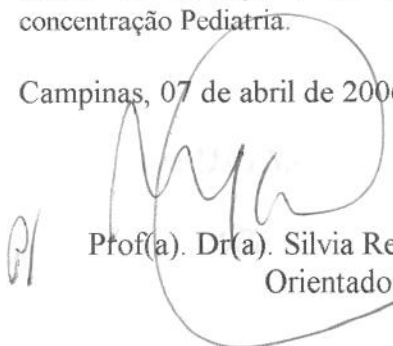


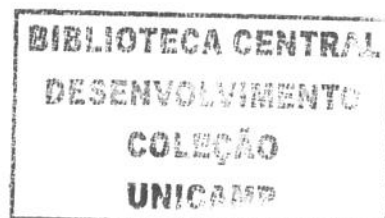
SIMONE DOS SANTOS AGUIAR

**PESQUISA DA AMPLIFICAÇÃO E/OU DELEÇÃO GÊNICA
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA
COMPARATIVA (CGH) E DA DELEÇÃO DOS GENES *P53*
E *RB1* ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO
IN SITU FLUORESCENTE (*FISH*) NO TECIDO DO
TUMOR DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM OSTEOSARCOMA**

Este exemplar corresponde à versão final do exemplar da Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Pediatria.

Campinas, 07 de abril de 2006.


Prof(a). Dr(a). Silvia Regina Brandalise
Orientadora



SIMONE DOS SANTOS AGUIAR

**PESQUISA DA AMPLIFICAÇÃO E/OU DELEÇÃO GÊNICA
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA
COMPARATIVA (CGH) E DA DELEÇÃO DOS GENES P53
E RB1 ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO
IN SITU FLUORESCENTE (FISH) NO TECIDO DO
TUMOR DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES
COM OSTEOSSARCOMA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para a obtenção do Título de
Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de
concentração Pediatria.*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise

CAMPINAS

2006



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

UNIDADE	BC
CHAMADA	T/UNICAMP
Ag 93p	
EX	
OMBO BC/	69931
ROC.	16.123-06
C	☐
D	☒
PREÇO	11.00
DATA	11.9.06

ID 386577

Ag93p

Aguiar, Simone dos Santos

Pesquisa da amplificação e/ou deleção gênica através da técnica de hibridização genômica comparativa (CGH) e da deleção dos genes P53 e RB1 através da técnica de *hibridização in situ* fluorescente (FISH) no tecido do tumor de crianças e adolescentes com osteosarcoma / Simone dos Santos Aguiar. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Silvia Regina Brandalise

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Genes P53. 2. Osteosarcoma - cirurgia. 3. Ossos - Doenças. 4. Crianças. 5. Hibridização de Acido Nucléico. I. Brandalise, Silvia Regina. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em ingles : Genes amplification and or deletions determined by CGH technique, together with P53 and RB1 analysis by FISH in Pediatric Osteosarcoma specimens

Keywords: • Genes P53

- Surgery, osteosarcoma
- Surgery, bones
- Child
- Nucleic Acid Hybridization

Área de concentração : Pediatria

Titulação: Doutorado em Saúde da criança e do adolescente

Banca examinadora: Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise

Prof Dr Antônio Fernando Ribeiro

Profa. Dra. Célia Beatriz Gianotti Antoneli

Profa. Dra. Isis Maria Quezado Soares Magalhães

Prof Dr Walter Pinto Junior

Data da defesa: 07-04-2006

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:

Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise

Membros:

1. Presidente e orientadora : Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise

> > Membros :

2. Prof. Dr. Antônio Fernando Ribeiro

3. Profa. Dra. Célia Beatriz Gianotti Antoneli

4. Profa. Dra. Isis Maria Quezado Soares Magalhães

5. Prof. Dr. Walter Pinto Junior

Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 07/04/2006

DEDICATÓRIA

*À minha amiga Silvia Regina Brandalise,
por fazer dos sonhos, realidade...*

*Aos meus pais Martha e Celso,
sem vocês, nada seria possível...*

À Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise, Professora Assistente do Departamento de Pediatria, Chefe da Disciplina de Oncohematologia Pediátrica da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, Diretora do Centro Infantil Boldrini, por seu exemplo formador e, tão marcante em todos os momentos de minha carreira.

À Bióloga Lilian de Jesus Giroto Zambaldi, do Serviço Citogenética e Biologia Molecular do Centro Infantil Boldrini, por sua amizade e, capacidade profissional na implantação da técnica de *CGH*, inédita na América Latina, sem a qual este estudo não teria sido realizado, meu muito obrigada.

Ao Bioquímico Adilson Manoel dos Santos, do Serviço de Citogenética e Biologia Molecular do Centro Infantil Boldrini, por seu auxílio nas técnicas de *FISH* e *CGH* empregadas neste estudo.

À Sra. Maria Alessandra Silva Salgado, Gerente de Dados do Centro Infantil Boldrini, pela análise estatística e formatação desta tese.

À Sra. Vera Silvia S. Froes Ficoni, Bibliotecária do Centro Infantil Boldrini, por sua ajuda na captação das referências bibliográficas desta tese.

À Profa. Ana Sabbag, pela revisão da língua portuguesa neste estudo.

Ao Engenheiro Tomaz Puga Leivas, Sra. Lúcia Maria Evangelista Ferraz e Sra. Márcia Salgado da Costa Amaral, pela análise estatística e formatação desta tese.

Aos Colegas Oncohematologistas do Centro Infantil Boldrini, que cuidaram dos meus pacientes durante a realização desta tese, meu obrigada.

Dr. Amilcar Cardoso de Azevedo.

Dra. Ana Cláudia Mendonça dos Anjos.

Dra. Ana Paula Bento Correa.

Dra. Andrea Fogli Maldonado.

Dr. Eduardo Ioshiteru Matsuda.

Dr. Emerson Gatti.

Dra. Érika Rodrigues Pontes.

Dra. Iva Santos Loureiro Neta.

Dr. Marcelo Rizzatti.

Profa. Dra. Maria José Mastellaro.

Dra. Marilene de Fátima Ribeiro.

Dra. Mônica Pinheiro de Almeida Veríssimo.

Dra. Paula Serrano Ferreira Hirose.

Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise.

Dra. Valéria Pereira Paiva.

Dra. Vitória Régia Pereira Pinheiro.

E, à Dra. Gisele Eiras Martins, médica oncopediatra do Hospital Pio XII / Barretos, SP e ex-residente em oncohematologia pediátrica do Centro Infantil Boldrini.

Aos Prof. Dr. José Carlos Barbi Gonçalves, Chefe do Serviço de Ortopedia do Centro Infantil Boldrini, e Prof. Dr. Alejandro Enzo Cassone, Professor Assistente do Serviço de Ortopedia do Centro Infantil Boldrini e da FCM de Jundiaí/SP e à Dra. Elisa Ribeiro Whitaker Sobral Vulcano, médica ortopedista do Serviço de Ortopedia do Centro Infantil Boldrini, por sua capacidade profissional causadora de grande impacto na cura de nossos pacientes.

Às Fisioterapeutas do Centro Infantil Boldrini, Fernanda Coutinho Barillari Vidal de Souza, Bianca Pratelezzi Deneno e Leticia Vieira Soares de Abreu, pelo carinho dedicado aos nossos pacientes durante a reabilitação, meu obrigada.

À equipe da Saúde Mental do Centro Infantil Boldrini, psicólogas: Profa. Elisa Maria Perina, Sandra Antônia Fanuchi Moraes de Almeida, Carla de Mello e Souza Moncada Leite e Dra. Ana Maria Osório Ferreira, pelo apoio aos nossos pacientes, em momento tão difícil de suas vidas, meu obrigada.

Aos médicos do Serviço de Radiologia do Centro Infantil Boldrini, Dr. Ruy Moraes Machado Guimarães, Dr. Ricardo A. C. Bidóia e Dr. Luis Augusto Mesquita Maia, por sua competência técnica e participação em nossas reuniões clínicas, meu obrigada.

“O Valor das coisas não está no tempo em que elas duram,

mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis,

coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa.

	PÁG.
RESUMO.....	xxi
ABSTRACT.....	xxv
1- INTRODUÇÃO.....	29
1.1- Classificação histopatológica dos osteossarcomas.....	36
1.2- Exames de imagem.....	39
1.3- Gene P53.....	44
1.4- Gene <i>RB1</i>	45
1.5- Citogenética.....	46
1.6- Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH).....	47
2- OBJETIVOS.....	49
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4- RESULTADOS.....	71
5- DISCUSSÃO.....	109
6- CONCLUSÕES.....	127
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
8- ANEXOS.....	145
Anexo I- Ficha de consentimento.....	147
Anexo II- Ilustrações dos casos de 1 a 41.....	149

RESUMO

Introdução. Os osteossarcomas (OS) são tumores agressivos, primários de osso, com prognóstico reservado. As deleções dos genes supressores de tumor, *RBI* e *P53*, localizados nos cromossomos 13 e 17 respectivamente, são freqüentemente encontradas neste tipo de tumor. As alterações citogenéticas encontradas nos OS são de alta complexidade, porém nenhuma delas é recorrente, não podendo caracterizá-lo. A técnica da Hibridização Genômica Comparativa (*CGH*) é uma ferramenta muito precisa para o estudo das deleções e amplificações gênicas ocorridas neste tumor. **Materiais e Métodos.** Tecido tumoral de 41 crianças com OS foi analisado pela técnica de *CGH* para pesquisar possíveis ganhos e/ou perdas gênicas. A técnica da Hibridização *In Situ* Fluorescente (*FISH*) foi realizada para estudar as deleções dos genes *P53* e *RBI*. Vinte e quatro pacientes eram do sexo feminino e 17 do sexo masculino, com mediana de 12 anos e 4 meses. **Resultados.** As anormalidades cromossômicas observadas com a técnica de *CGH* foram diversas e variadas, especialmente ganhos nos cromossomos 1p, 2p, 3q, 5q,5p e 6p e, perdas nos cromossomos 14q (50% no -14q11.2), 15q e 16p. Alto índice de perdas foi observado no cromossomo 21 (26 de 41 casos; $p=0,008$), sendo a região mais freqüentemente afetada a 21q11.2. Com relação ao estudo dos supressores tumorais, a deleção do *P53* ocorreu em 68,3% dos casos ($p=0,02$) e do *RBI* em 87,5% dos casos ($p=0,000001$). **Conclusão.** Apesar de ambos supressores (*P53* e *RBI*) estarem deletados na maioria dos pacientes, este evento parece não estar associado ao prognóstico. Anormalidades ainda não reportadas presentes no cromossomo 21 nos OS pediátricos, sugerem que a sequência mapeada nesta região cromossômica possa estar envolvida na patogênese deste tumor.

Palavras chave: hibridização genômica comparativa, genes *P53* e *RBI*, osteossarcoma.

ABSTRACT

Background. Osteosarcomas (OS) are aggressive bone tumors and often have a poor prognosis. It is already known that abnormalities in chromosomes 13 and 17 are frequently observed in OS patients, being also expected a deletion of *RB1* and *P53* genes. The tumors exhibit karyotypes with a high degree of complexity, that has made it difficult to determine if any recurrent chromosomal aberrations could characterize OS. To address inherent difficulties associated with classical cytogenetic analysis, comparative genomic hybridization (CGH) has been applied to OS tissue. **Patients and Methods.** Forty one pediatric OS specimens were analyzed by CGH techniques, and the expression of *RB1* and *P53* were analyzed by *FISH*. Twenty four patients were girls and 17 boys. Median age was 12 years and 4 months. **Results.** Chromosomal abnormalities were highly diverse and variable, specially gains in chromosome 1p, 2p, 3q, 5q, 5p and 6p and losses in chromosome 14q (50% in -14q11.2), 15q and 16p. High level of losses in chromosome 21 were present (26 of 41 cases; $p=0,008$), being 21q11.2 region the most frequent one. Concerning about genes expression, *P53* is deleted in 68,3% of the cases ($p=0,02$) and *RB1* in 87,5% ($p=0,000001$). **Conclusion.** Although both oncogenes (*P53* and *RB1*) are deleted in OS population, it remains impossible to determine if this abnormality is a prognostic factor. These new and unreported findings in chromosome 21 of pediatric OS tumors, suggest that specific sequences mapping these chromosomal regions, would likely to play a role in the development of OS.

Key words: comparative genomic hybridization, *P53* and *RB1* genes, osteosarcoma.

1- INTRODUÇÃO

O osteossarcoma é o tumor ósseo mais freqüente da infância e adolescência, totalizando 5% de todos os tumores sólidos em pediatria (ENTZ-WERLE, 2003). É constituído de células malignas fusiformes, originárias do osso, raramente de partes moles, havendo a produção de matriz osteóide ou de tecido ósseo imaturo (FERRARI, 2001).

De acordo com o *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER), programa de Registro de Câncer de Base Populacional dos Estados Unidos, a incidência anual do osteossarcoma é de aproximadamente 8,7 casos por milhão de crianças e adolescentes com idade inferior a vinte anos, sendo o sexto tumor maligno mais freqüente da infância, e o terceiro mais freqüente entre os adolescentes e adultos jovens (GURNEY, 1999).

Somente metade dos tumores ósseos, na faixa etária pediátrica, são malignos. Destes, o osteossarcoma é o mais freqüente, correspondendo a 35% de todos os sarcomas primários do osso e a 56% de todos os tumores malignos do osso, que ocorrem nas duas primeiras décadas de vida. A cada ano, nos Estados Unidos da América, são diagnosticados 400 casos novos, com discreto predomínio pelo sexo masculino e descendentes de negros. O pico de incidência é bimodal, sendo o primeiro na segunda década de vida (durante o estirão de crescimento, aos 16 anos nas meninas e aos 18 anos nos meninos) e o segundo pico, ocorre aos sessenta anos. É extremamente raro em crianças com menos de 5 anos de idade. Tem predileção pela porção metafisária do osso (fêmur distal, tíbia proximal e úmero proximal), sendo 50% deles ao redor do joelho. Entretanto, o osteossarcoma também pode ocorrer em esqueleto axial (menos de 10% dos casos), sendo a região pélvica a mais acometida em pacientes pediátricos (MARINA, 2004; AL-ROMAIH, 2003; PIZZO, POPLACK, 2002).

O conhecimento em relação à etiologia do osteossarcoma, ainda é limitado. Desde a década de 1950, existem publicações que correlacionam o estirão do crescimento, e a estatura final, com o aparecimento do osteossarcoma (TJALMA, 1966; PRICE, 1958). Este tumor aparece também em muitos casos, antes ou depois do estirão do crescimento (MARINA, 2004; PIZZO, POPLACK, 2002). COTTERILL et al., 2004, em análise de 364 pacientes inscritos no Protocolo Cooperativo para Tratamento de Tumores Ósseos do Reino Unido (UKCCSG), documentaram que os pacientes com osteossarcoma primário de

fêmur eram significativamente mais altos que os demais pacientes do grupo, concluindo que maior estatura e crescimento puberal precoces pudessem ser fatores etiológicos preditivos para maior incidência do osteossarcoma ($p=0.0001$).

A partir de 1960, um fator de risco bem documentado para o desenvolvimento de osteossarcoma é a exposição à radiação, constituindo 3,4 - 5,5% de todos os osteossarcomas, sendo que o risco estimado da ocorrência deste tumor em osso irradiado é de 0,03 - 0,8% (**FOREST, 2002**). Como o tempo decorrido entre a exposição à radiação e o aparecimento do tumor é longo (de 4 a 40 anos, com média de 12 a 16 anos), este fator não tem sido considerado relevante no aparecimento do osteossarcoma *de novo* (**HUVOS, 1991; TUCKER, 1990; TUCKER, 1987; WEATHERBY, 1981; HASELOW, 1978; PHILLIPS, 1963**).

Por volta de 1920, o conhecimento que se tinha era que, se não houvesse possibilidade cirúrgica, estes pacientes morreriam. Por outro lado, se houvesse cirurgia, morreriam da mesma maneira. Só restavam as orações (**CADE, 1955**). Entre 1960 e início da década de 1970, houve pouco avanço terapêutico. Apesar da cirurgia agressiva, mais de 80% das crianças sem doença metastática apresentavam recidiva de tumor e morriam após cinco anos do diagnóstico. A sobrevida destes pacientes com cirurgia e radioterapia era pobre (15–20%). Nas últimas três décadas, progressos têm sido alcançados no entendimento da biologia e etiologia dos osteossarcomas, assim como na terapêutica, tanto quimioterápica quanto cirúrgica, conservando-se o membro afetado pelo câncer, e oferecendo a estes pacientes uma expectativa de sobrevida livre de doença em 3 a 5 anos entre 60% e 70%. Progressos na genética e biologia molecular aprimoraram o conhecimento da patogênese, abrindo novas perspectivas para a cura desta doença (**MARINA, 2004; PIZZO, POPLACK, 2002**).

Nos últimos 25 anos os resultados têm melhorado para os pacientes com osteossarcoma das extremidades. Como ocorrido com os demais tumores sólidos em pediatria, tem-se tentado determinar fatores prognósticos que possam ser utilizados para a melhoria das estratégias terapêuticas do osteossarcoma, levando ao aumento da sobrevida destes pacientes. Não há dúvida que a doença metastática tem pior prognóstico, e que a resposta à quimioterapia pré-operatória, avaliada pelo grau de necrose encontrado na peça

cirúrgica, é indicativa da quimiossensibilidade *in vivo*. Em 1982, **ROSEN** foi o primeiro a provar este fato, propondo, inclusive, mudança na estratégia terapêutica pós-operatória, de acordo com os resultados histopatológicos do tumor, na tentativa de resgatar estes pacientes. Até hoje, a eficácia desta estratégia é discutível (**CRAFT, 2004**).

Cerca de 20% dos pacientes com osteossarcoma são metastáticos ao diagnóstico. Para eles, a expectativa de sobrevida em 3 anos é de 10 a 40%. Entretanto, quando a metástase é pulmonar e unilateral, ou sendo ressecadas cirurgicamente, com bom grau de necrose histológica pós quimioterapia, a sobrevida pode chegar a 75%, segundo os resultados do Grupo Cooperativo Alemão (**COSS**). Para os pacientes com lesões ósseas multifocais, os resultados são catastróficos (**KAGER, 2003**). Resultados semelhantes foram relatados pelo Grupo Cooperativo Japonês, analisando 280 pacientes com osteossarcoma de extremidades e com metástase pulmonar ao diagnóstico, obtendo sobrevida em 2 anos de 30% (**TSUCHIYA, 2002**).

A busca de outros fatores prognósticos, determinados ao diagnóstico, continuou sendo de relevância para que se pudesse direcionar a estratégia terapêutica. Parecia óbvio que o tamanho do tumor pudesse ser um destes fatores. Entretanto, dificuldades em estipular-se a maneira de medir estes tumores não permitiram confirmar esta hipótese. **BACCI et al., 2000**, do *Rizzoli Institute di Bologna*, Itália, estudando 965 pacientes com osteossarcoma, comparando o atraso no diagnóstico com a evolução clínica, não conseguiram provar relação entre o tamanho do tumor e algum tipo de influência nos resultados. **BIELACK et al., 2002**, analisando 1.702 pacientes com diagnóstico de osteossarcoma, tratados com o Protocolo do Grupo Alemão (**COSS**), concluíram que havia correlação entre o tamanho do tumor e o prognóstico. Conseguiram avaliar a extensão da doença, baseados no quanto o osso envolvido estava acometido pelo tumor. Recentemente, **KASTLE et al., 2004**, analisaram retrospectivamente, através da ressonância nuclear magnética (por apenas um radiologista), a medida tridimensional de 42 tumores tratados no *St. Jude Children's Research Hospital, TN*, EUA, demonstrando significativa correlação entre tamanho do tumor e a sobrevida. **CRAFT, 2004**, referiu que, com a tecnologia hoje disponível, os grandes grupos cooperativos poderiam ou não confirmar estes achados, embora isto talvez não fosse necessário, sugerindo que esforços deveriam ser dirigidos para

a pesquisa de novos marcadores biológicos, que pudessem ser identificados como fatores prognósticos para estes tumores, auxiliando na definição da melhor estratégia terapêutica, para aumento da sobrevida destes pacientes.

Na maioria dos osteossarcomas primários, a etiologia é desconhecida. Em 30 a 40% dos casos, encontra-se mutação hereditária do gene *RBI* ou do gene *P53* como parte da Síndrome de Li-Fraumeni (ALONSO, 2001; MALKIN, 1990; HUVOS, 1977). Estes dois genes, localizados nos cromossomos 13q14 e 17p13, respectivamente, parecem estar envolvidos na oncogênese do osteossarcoma de alto grau. O modelo de oncogênese atualmente aceito para este tipo de tumor corresponde a várias alterações genômicas, ainda não totalmente esclarecidas (ENTZ-WERLE, 2003).

São três as principais alterações genéticas observadas nos sarcomas: translocações sem alterações cariotípicas levando a disfunção de outros genes codificadores de proteínas envolvidas nas vias reguladoras do gene do retinoblastoma (*RBI*) e do gene *P53* (OVERHOLTZER, 2003; MITELMAN, 2000). Recentes estudos têm demonstrado alterações citogenéticas no osteossarcoma, sendo a maioria com diferentes alterações clonais, em análises de material do mesmo paciente. As anormalidades mais comumente observadas incluem ganho no cromossomo 1, perda dos cromossomos 9, 10, 13 e/ou 17, perda completa ou parcial do braço longo do cromossomo 6. Anormalidades estruturais freqüentemente incluem rearranjos nos cromossomos 11, 19 e 20 (BAYANI, 2003; SANDBERG, 2003; BOEHM, 2000).

LADANYI, 2000, estudou as variações genéticas que resultam em inativação do gene supressor de tumor e a superexpressão dos oncogenes em osteossarcomas. Particularmente nestes tumores, há a inativação da via reguladora tanto do gene *RBI* quanto do gene *P53*, danificando a regulação da proliferação celular. Estas alterações podem fazer parte de uma seqüência no processo de desregulação da fase *G1* até a fase *S* do ciclo celular, impedindo que os genes alcancem seus efeitos reguladores no ciclo celular. Devido a estas várias alterações em múltiplos genes, o mecanismo envolvido nas alterações nos genes *RBI* e *P53* no osteossarcoma, precisa ser melhor estudado (SANDBERG, 2003; NAKASHIMA, 2003).

Além do conhecido envolvimento dos genes *P53* e *RBI* o número de *locus* com perda de heterozigose (3q, 13q, 17p, 18q) sugere que outros genes supressores de tumor possam estar envolvidos na patogênese do osteossarcoma (PATIÑO-GARCÍA, 2003). A maioria dos tumores tem a inativação combinada de ambos os genes de supressão. Aproximadamente 3% dos pacientes com osteossarcoma esporádico têm a mutação de linhagem germinativa do gene *P53* (KRUZELOCK, 1997).

Os sobreviventes de retinoblastoma têm maior probabilidade de ter segunda neoplasia, sendo o osteossarcoma o tipo mais comum. Na hereditariedade do retinoblastoma, a mutação germinativa do gene *RBI* é comum, tornando-se a base para o aparecimento do segundo tumor. A mutação germinativa do gene *P53* também está relacionada à alta probabilidade do aparecimento de câncer, dentre eles, o osteossarcoma (Síndrome de Li-Fraumeni). A expressão protéica do gene *P53* em células normais, aumenta em resposta ao dano do DNA, direcionando estas células a pararem sua proliferação e/ou induzindo-as à morte celular (GOKGOZ, 2001).

O gene *RBI* tem papel regulador do ciclo celular. Apesar das mutações germinativas, tanto do gene *RBI* quanto do gene *P53*, serem raras, elas estão presentes na maioria dos casos de osteossarcoma e, por isso, não podem ser consideradas, isoladamente, como um fator prognóstico para este tipo de câncer. Entretanto, sua presença nos casos de osteossarcoma esporádico talvez tenha importância prognóstica, embora ainda não tenha sido relacionada às recorrências do tumor (MARINA, 2004;SETH,1993).

CARBONE, 1996, sugeriu que o osteossarcoma pudesse ter etiologia associada a vírus, no caso, o *SV40-like*, um poliovírus de DNA que apresenta três proteínas T - uma delas com função desconhecida, outra com habilidade de transformação celular e outra que auxilia na replicação viral, interagindo com os genes *P53* e *RBI*, promovendo a proliferação celular, por inibição da função do gene *P53*. MENDOZA, 1998, demonstrou que não há correlação entre o *SV40* e a mudança da função dos genes *P53* e *RBI*. Até a presente data, não parece haver comprovação da etiologia viral no osteossarcoma (MARINA, 2004).

A sobrevida dos pacientes com osteossarcoma é dependente de um conjunto de fatores, como a presença de metástase ao diagnóstico, a localização do tumor em extremidades ou no esqueleto axial, em alguns casos com o volume do tumor e, principalmente, a resposta à terapêutica empregada, tanto quimioterápica quanto cirúrgica. Dentre eles, o único fator que ainda permanece como indicativo de prognóstico, além da resposta histológica, é a presença de metástase, e a localização axial **(OZAKI, 2003; BIELACK, 2002)**. Apesar dos níveis séricos da desidrogenase láctea e da fosfatase alcalina serem correlacionados ao prognóstico, estes dois marcadores são indicativos apenas de grande proliferação celular, ou seja, da atividade do tumor **(PIZZO, POLACK, 2002)**.

1.1- Classificação Histopatológica dos Osteossarcomas

O osteossarcoma de alto grau de malignidade, mais freqüente na faixa etária pediátrica, é um tumor ósseo de origem intramedular (apenas 3% de todos os osteossarcomas são paraosteais), que tem em comum a proliferação de células mesenquimais e produção de matriz osteóide **(HOWARD, 1998)**. A quantidade de osteóide e/ou produção de matriz osteóide varia em cada tipo de tumor. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o osteossarcoma em cinco subtipos **(RAYMOND, 2002; KALIL, 2002; MATSUNO, 2002)**.

1.1.1- Osteossarcoma Osteoblástico

O tumor é composto por osteóide ou matriz óssea preponderante, por células osteoblásticas do tipo plasmocitóide e epitelióide, com número variável de células pequenas redondas ou ovóides, células fusiformes, células anaplásicas gigantes mono ou multinucleadas. A matriz pode ser constituída por densas lâminas de osteóide e/ou tecido ósseo, intercalado por trabéculas ou por fragmentos de osteóide **(Figura 1)**.

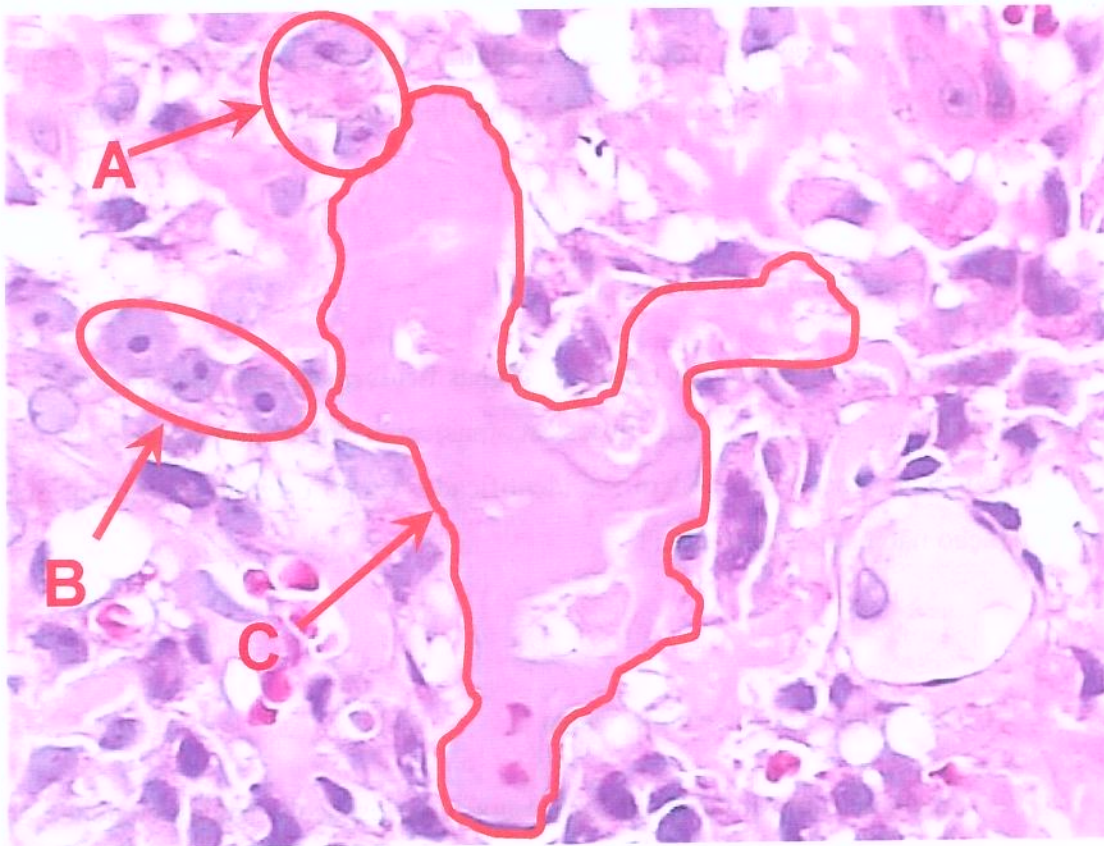


Figura 1- Osteossarcoma Osteoblástico. A) células osteoblásticas do tipo plasmocitóide; B) à esquerda, células do tipo epitelióide; e, em C) na área central: matriz osteóide (H&E 400X).

1.1.2- Osteossarcoma Condroblástico

O tumor apresenta predomínio de matriz condróide, usualmente assemelha-se à cartilagem hialina, com células malignas formando lacunas, ou áreas pseudotrabeculares.

1.1.3- Osteossarcoma Fibroblástico

É tumor composto por células malignas fusiformes, com escassa área de matriz osteóide, similares às células dos fibrossarcomas, com focos homogêneos de material eosinofílico. Estes focos não podem ser identificados como osteóide primitivo, quando a mineralização não estiver presente.

1.1.4- Osteossarcoma Teleangiectásico

Aparece como uma lesão lítica pura, com espaços císticos contendo sangue, separados por septos fibrosos, circundados por células tipo osteoclásticas gigantes, simulando o cisto ósseo aneurismático. No interior dos septos fibrosos e na periferia da lesão, existe número variável de células malignas altamente pleomórficas, mas tipicamente limitadas com porções osteóide. Um pequeno número de células malignas isoladas, permeadas por sangue, formando pequenos espaços císticos, também pode ser encontrado.

1.1.5- Osteossarcoma de Pequenas Células

Composto por células malignas pequenas e redondas, ou mais raramente por células fusiformes, que podem mimetizar o diagnóstico de Sarcoma de Ewing / PNET. Apesar de expressar positividade para *MIC - 2*, não apresenta a translocação entre o cromossomo 11 e o 22 (t11;22). Nesta variante histológica, as pequenas células redondas são circundadas por áreas focais de tumor osteóide e/ou depósito osteóide perivascular.

1.2- Exames de Imagem

1.2.1- Rx simples, Tomografia Computadorizada e Ressonância Nuclear Magnética

O aspecto radiológico do osteossarcoma (**Figuras 2, 3, 4 e 5**) é de uma lesão lítica permeativa e destrutiva, com zonas de transição pobremente definidas ao longo do osso normal, com falta de reposta endosteal. Pode haver ossificação em partes moles, formando os chamados “raios de sol”, e formação periosteal com levantamento do córtex (triângulo de *Codman*) (**PIZZO, POPLACK, 2002; ROSEN, 2000**).



Figura 2- Rx simples do fêmur, apresentando reação periosteal (triângulo de *Codman*), imagens radiopacas irregulares e aumento de partes moles.

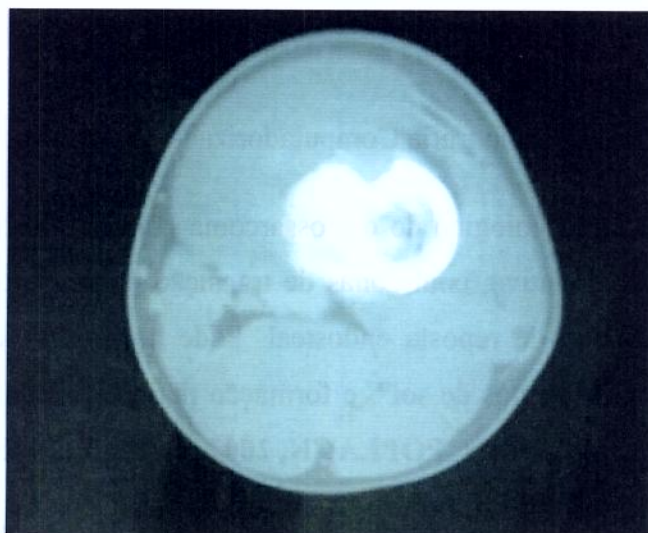


Figura 3- Tomografia Computadorizada do fêmur apresentando lesão mal delimitada em porção diafisária do osso, osteocondensante com reação periosteal, massa em partes moles, erosões corticais e envolvimento de vasos.



Figura 4- Ressonância Nuclear Magnética da tíbia, mostrando volumosa lesão expansiva infiltrativa, em 1/3 proximal do osso, com destruição da cortical e extensa infiltração medular.

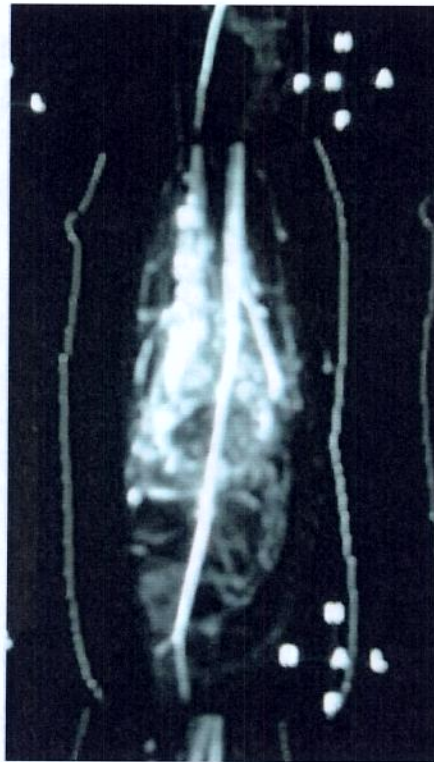


Figura 5- Angiorressonância Magnética do membro inferior, evidenciando volumosa massa envolvendo fêmur, com extensão para planos musculares adjacentes, envolvendo a artéria poplítea.

1.2.2- Cintilografia óssea com tecnécio 99-mTC

Importante exame com radioisótopos, para avaliação da extensão do tumor em seu sítio primário, com a detecção de *skip* – metástases (**Figura 6**) e envolvimento ósseo à distância (**MARINA, 2004; PIZZO, POPLACK, 2002**).



Figura 6- Cintilografia óssea corporal realizada com Tecnécio *99-mTC*, evidenciando intensa captação do radiofármaco, na área do tumor localizado na porção distal do fêmur esquerdo.

1.2.3- Cintilografia com sestamibi *99-mTC*

O sestamibi *99-mTC* é um cátion lipofílico usado na cintilografia para avaliação de sarcomas ósseos e de partes moles, sendo importante para a avaliação da extensão do tumor. Sua captação (**Figura 7**) parece ser inversamente proporcional à expressão positiva da glicoproteína P (*GpP*). **VERGOTE, 1998**, analisou este radiofármaco em osteossarcomas, e comparando-o à expressão positiva da *GpP* nestes tumores, sugeriu que a adição de drogas que pudessem reverter o fenômeno de resistência aos quimioterápicos não relacionados aos esquemas terapêuticos convencionais (ex. ciclosporina- A), para melhorar a sobrevida livre de doença destes pacientes.

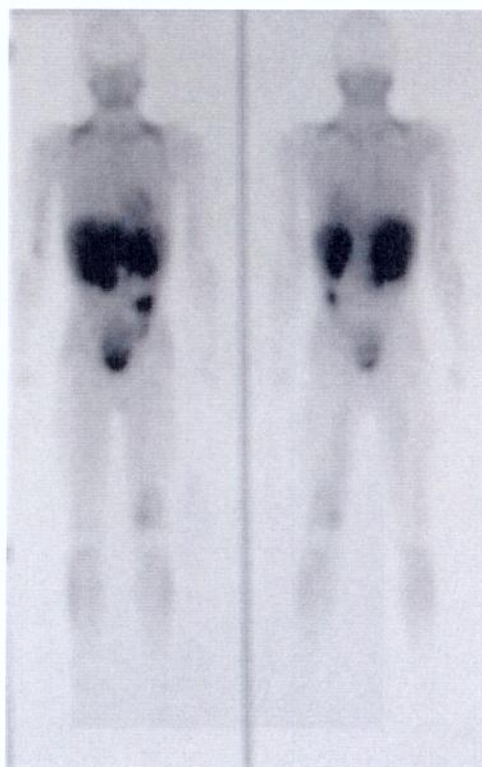


Figura 7- Cintilografia corporal, realizada com Sestamibi ^{99m}Tc , mostrando captação do radiofármaco, na área do tumor, localizado na porção distal do fêmur esquerdo.

1.3- Gene *P53*

Os tumores malignos, ditos esporádicos, surgem em decorrência de uma série de alterações celulares somáticas, causadas por deleções cromossômicas, rearranjos ou mutações nos oncogenes e nos supressores tumorais. Os oncogenes possuem um importante papel nas funções metabólicas celulares, como crescimento e diferenciação enquanto os genes supressores tumorais bloqueiam a proliferação celular descontrolada que pode levar ao câncer. Um dos supressores tumorais mais envolvidos com os processos neoplásicos é o *P53* localizado no braço curto do cromossomo 17 no locus 13 (17p13). O *P53* é ativado em resposta a sinais de dano celular. Codifica um fator de transcrição que interage com outros genes, induzindo a parada do ciclo celular em G1, para o reparo do gene danificado ou quando isso não é possível, leva a célula a apoptose. Quando o *P53* está mutado, a célula

com o DNA danificado escapa do reparo e da apoptose, levando a formação do tumor (MARINA,2004;HAINAULT,1997).

Em várias neoplasias as mutações no gene *P53* tem sido associadas ao pior prognóstico e a uma menor resposta à quimioterapia. Nos osteossarcomas, alterações no *P53* ocorrem em até 20% dos casos. Embora esta correlação prognóstica ainda não tenha sido estabelecida, alguns autores demonstraram que nas recidivas pulmonares, as alterações no *P53* tendem a sugerir uma pior evolução clínica (FERRARI,2004; TRIEB,2001).

Em algumas malignidades , a mutação de um alelo do gene *P53* é acompanhada pela deleção do outro alelo e o resultado é a ausência da proteína *P53* selvagem. A deleção monoalélica do gene *P53* em osteossarcoma, pode ser detectada através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*), HEIM,1995.

1.4- Gene *RBI*

O gene *RBI* codifica uma proteína nuclear que é ativa quando relativamente não fosforilada, mas pouco ativa quando é fosforilada pelas cinases dependentes de ciclina, antes da fase S do ciclo celular. Em seu estado fosforilado ativo, a pRb se liga a membros do complexo de transcrição E2F, inativando-os. Este complexo é necessário à progressão para a fase S, de modo que sua inativação por *RBI* bloqueia o ciclo celular. Este bloqueio só é liberado quando pRb é inativado por fosforilação. A reativação do ciclo celular ocorre quando seus grupamentos fosfato são removidos. Entretanto, quando existe uma mutação no gene *RBI*, ocorre perda de função, levando a inativação permanente. O ciclo celular fica “sem freio”, e a célula entra em multiplicações descontroladas levando ao desenvolvimento de um tumor. (GRANA, 1998).

Nos últimos anos com a introdução de protocolos poliquimioterápicos, ocorreu melhora no prognóstico dos pacientes com osteossarcoma. Porém 30 a 40% destes ainda têm evolução desfavorável. Em 1986, FRIEND caracterizou o gene *RBI* como sendo um gene supressor tumoral. A perda de sua função tem importante papel no desenvolvimento do retinoblastoma, tanto no tipo esporádico quanto no familiar. Esta inativação também está

associada à patogênese de outros tumores como os sarcomas de partes moles, os carcinomas de bexiga e de pulmão e os osteossarcomas. A perda da heterozigose do gene *RBI* está presente em 50% dos pacientes portadores de osteossarcomas e está associada a pior prognóstico (IIDA, 2003). A deleção do gene *RBI* em doentes com osteossarcomas pode ser detectada através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*), HEIM, 1995.

1.5- Citogenética Molecular

O osteossarcoma é tumor ósseo maligno, caracterizado por cariótipo extremamente complexo, e com freqüentes ganhos gênicos. Estes ganhos podem resultar em superexpressão de genes, que podem contribuir para a instabilidade gênica dos osteossarcomas. A perda de heterozigose nos braços dos cromossomos 3q, 13q, 17p e 18q tem sido encontrada em osteossarcomas, sendo a mais freqüente a dos cromossomos 13q e 17p, que podem refletir a inativação do *RBI* e *P53* (OZAKI, 2003). A identificação destes genes em seus sítios de amplificação é de fundamental importância para o entendimento da biologia e do comportamento clínico desta doença (SQUIRE, 2003; PINKEL, 1998).

O ganhos gênicos nos osteossarcomas têm sido pesquisados por diferentes técnicas moleculares, como por exemplo a *PCR*, *FISH* e o *Southern Blotting*. Atualmente, a técnica da Hibridização Genômica Comparativa (*CGH*) permite a análise dos ganhos e perdas genômicas, identificando o número de cópias de DNA presentes nos cromossomos do material tumoral, que também podem ser confirmadas pela técnica de *FISH* (MAN, 2004). Em osteossarcomas, estudos através da técnica *CGH*, já identificaram ganhos gênicos em diversos cromossomos como: 1p22, 1p31, 1q21, 1q23, 2q24, 3p25, 3q26, 6q24.3, 4q12, 5p14-p15, 5q33, 6p12-p21, 6q24.3, 7p21-p22, 8q12-q23, 10p21, 10q11.1, 10q22, 11q13, 11q23, 12p13, 12q12-q15, 17p11.2, 17q21, 18q22, 19p13.1 e 20p11.2 (LAU, 2004; ZIELENSKA, 2001; STOCK, 2000).

A técnica *CGH* detecta alterações gênicas (ganhos e perdas das cópias de DNA) maiores que 5-10 Mb de todo o genoma em uma única hibridização, sem envolver cultura de células (SANDBERG, 2003; KUUTILA, 1998; BENTZ, 1998; PIPER, 1995;

KALLIONIEMI, 1994). KALLIONIEMI, 1992 foi um dos primeiros a empregar a *CGH* para o estudo de tumores sólidos. O DNA tumoral é isolado e, através da reação *de Nick Translation*, é marcado utilizando um fluorocromo. Como padrão é utilizado DNA normal também marcado com um fluorocromo, mas de uma cor diferente da empregada no DNA tumoral. Estes DNA sofrem uma co-precipitação e são hibridizados a metáfases normais. Após lavagens para retirada das hibridizações inespecíficas, realizada-se a análise dos ganhos e perdas gênicas tumorais. Esta técnica vem sendo amplamente utilizada no estudo gênico dos tumores sólidos, na tentativa de identificar oncogenes e genes de supressão tumoral envolvidos no diagnóstico e na progressão dos tumores sólidos. A técnica de *CGH* permite a análise genética detalhada de cada região do cromossomo envolvido no desenvolvimento tumor (**VARELLA-GARCIA, 2003**).

Nos osteossarcomas, a técnica de *CGH* tem sido utilizada na tentativa de se entender as diferentes alterações citogenéticas, identificando os ganhos e as perdas cromossômicas (**ZIELENSKA, 2001**), revelando as mais diversas alterações na sequência de DNA, que podem ou não ter relação com a etiologia e a evolução do osteossarcoma (**OSAKI, 2003**).

A amplificação gênica produz uma instabilidade genômica e, por isso, está claramente associada à progressão tumoral, além de ter significado prognóstico. Estas amplificações são freqüentemente vistas em um nível citogenético como os *double minutes* (*dmin*) e as regiões coradas homogeneamente (*hsrs*). Contudo, o reconhecimento citogenético não permite o mapeamento e identificação de seqüências de DNA amplificado, sendo a *CGH* o método ideal para o reconhecimento destas alterações (**MAN, 2004**).

1.6- Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

A procura por genes específicos associados ao desenvolvimento do osteossarcoma iniciou após a constatação de que os resultados citogenéticos obtidos convencionalmente não eram específicos. Embora não necessariamente específico ao osteossarcoma, um número de genes importante foi identificado, incluindo vários genes supressores tumorais, oncogenes e genes codificadores de fatores de crescimento. Os genes mais associados ao osteossarcoma são os genes *RBI* e *P53* (**BRIAN, 2002**).

O estudo da deleção dos genes *RBI* e *P53* foi realizado pela técnica de *FISH*, que utiliza sondas específicas das regiões gênicas, 13q14 e 17p13.1 respectivamente, marcadas com fluorocromo . As sondas são hibridizadas com o material tumoral disposto em lâmina. Após a lavagem das lâminas para retirada das hibridizações inespecíficas, a análise é realizada em microscópio de fluorescência (HEIM,1995).

2- OBJETIVOS

- 1- Visualizar a amplificação e/ou deleção de regiões cromossômicas específicas com a técnica de Hibridização Genômica Comparativa (*CGH*), em material de tecido do tumor de osteossarcoma, diagnosticado em crianças e adolescentes.
- 2- Pesquisar a deleção do gene *P53* no tecido tumoral de pacientes com osteossarcoma, pela técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (*FISH*).
- 3- Pesquisar a deleção do gene *RBI* no tecido tumoral de pacientes com osteossarcoma, pela técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (*FISH*).
- 4- Correlacionar os achados citogenéticos à possíveis fatores clínicos prognósticos.

3- MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo baseou-se em análise citogenética, através da técnica de *CGH*, de DNA extraído de material de biópsia diagnóstica de osteossarcomas, de crianças e adolescentes, diagnosticados e tratados no Departamento de Oncologia do Centro Infantil Dr. Domingos A. Boldrini, Campinas/SP, no período de janeiro de 1999 a outubro de 2005.

Neste período, 52 pacientes foram diagnosticados com osteossarcoma. Dos 52 pacientes registrados no serviço, 41 foram considerados analisáveis. Foram excluídos os pacientes dos quais não foi possível extrair DNA do tecido da biópsia diagnóstica do tumor, por não armazenamento adequado do tecido tumoral em banco de tumor, e aqueles cujos pais não deram o consentimento livre esclarecido para inclusão do material no estudo (ANEXO I).

Objetivando a uniformização dos diagnósticos histopatológicos, os 41 casos foram revisados pela Profa. Dra. Izilda Aparecida Cardinalli (Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Centro Infantil Boldrini / Professora Titular do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da USF), e pelo Prof. Dr. André Schenka (Professor do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP).

3.1- Soluções utilizadas para a realização da Técnica de Híbridização in situ Fluorescente (FISH)

- **20X SSC, pH 5.3**

Diluir 175g de NaCl e 88g de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 800 mL de água destilada, ajustando pH com HCl 1N e completando o volume final para 1 litro.

- **Solução de desnaturação**

Adicionar 49 mL de formamida, 7 mL de 20X SSC (pH 5.3) e 14 mL de água destilada. O pH foi ajustado entre 7,0 e 7,5, em temperatura ambiente. Entre os usos, a solução foi mantida a 4°C.

- **Soluções de etanol para desidratação (a 70%, 85% e 100%)**

Diluir o etanol absoluto com água destilada para preparar as soluções de etanol 85% e 70% (v/v).

- **Solução de lavagem 0.4X SSC/0.3% NP-40**

Um volume de 0,4mL do 20 x SSC foi pipetado para um borel contendo 40 ml de água destilada.. Após adicionar 120μL de NP-40 (*nonidet* P40), homogeneizar. O pH foi ajustado entre 7.0 e 7.5 com NaOH 0,1N.

- **Solução de lavagem 2X SSC/0.1% NP-40**

Um volume de 2mL do 20 x SSC foi pipetado para um borel contendo 40 ml de água destilada.. Adicionado 40μL de NP-40 (*nonidet* P40) e homogeneizar. O pH foi ajustado entre 7.0 e 7.5 com NaOH 0,1N.

- **Controle de DNA marcado com *SpectrumGreen* (Vysis-Downers Grove, IL, USA)**

3.2- Metodologia para técnica de *FISH*

3.2.1- Princípio da técnica de *FISH*

A Hibridização *in situ* Fluorescente (*FISH*) é um método que permite identificar uma sequência alvo de DNA através do uso de uma sonda. Esta é uma sequência complementar ao alvo, marcada com fluorocromo. O princípio básico é a hibridização da sonda com o DNA do material a ser estudado, que será analisado em microscópio de fluorescência (JORDE, 2000).

3.2.2- Sondas utilizadas para a pesquisa através da técnica de *FISH*

A técnica de *FISH* para a análise da deleção do gene *P53*, foi realizada utilizando a sonda de sequência específica *LSI P53* (17p13.1), *Vysis-Downers Grove, IL, USA*, marcada com *SpectrumOrange* que gera uma coloração vermelha sob filtro de fluorescência *TRICT* (Tetramethyl rhodamine isothiocyanate). Esta sonda possui aproximadamente 145Kb e hibridiza a região p13.1 do cromossomo 17, onde localiza-se o gene *P53* (Figura 8).

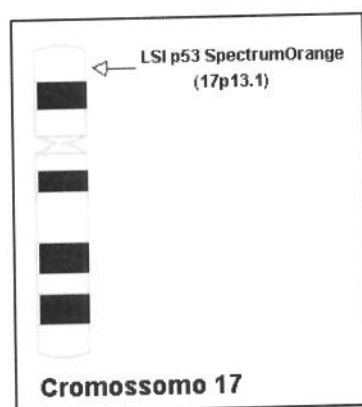


Figura 8- Ideograma do cromossomo 17, indicando a localização do gene *P53*

A técnica de *FISH* para a análise da deleção do gene *RBI*, foi realizada utilizando a sonda de sequência específica *LSI 13 (RBI) 13q14*, *Vysis-Downers Grove, IL, USA*, marcada com *SpectrumOrange* que gera uma coloração vermelha sob filtro de fluorescência *TRICT* (Tetramethyl rhodamine isothiocyanate). Esta sonda possui aproximadamente 220Kb e hibridiza a região q14 do cromossomo 13, onde localiza-se o gene *RBI* (Figura 9).

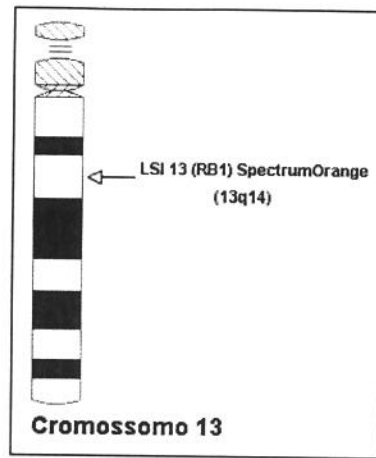


Figura 9- Ideograma do cromossomo 13, indicando a localização do gene *RB1*

3.2.3- Preparo da lâmina com o material tumoral para a técnica de *FISH*

O material utilizado para análise através da técnica de *FISH* foi obtido de tumores emblocados em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 5µm, dispostos na região central de lâminas silanizadas, método de pré tratamento da lâmina que impede que o corte se solte durante o procedimento de hibridização e lavagem. Antes de começar o procedimento a lâmina com o corte deve ser mantida a 60°C por 2 horas, para fixação do material.

3.2.4- Preparo da sonda para realização da técnica de *FISH*

As duas sondas utilizadas, *P53* e *RB1*, foram diluídas da mesma maneira, seguindo as orientações do fabricante (*Vysis-Downers Grove, IL, USA*). Foi pipetado em um tubo de microcentrifuga 1µL de sonda, 2µL de água bidestilada estéril e 7µL do tampão de hibridização, presente no *kit* do fabricante.

3.2.5- Tratamento pré hibridização para realização da técnica de *FISH*

A lâmina com o corte histológico tumoral necessita um pré tratamento para possibilitar a hibridização. Este tratamento constitui em submergir as lâminas em uma sequência de três boréis contendo xilol P.A. durante 10 minutos sob agitação constante, com o intuito de retirar da parafina. Para retirar o excesso de xilol, as lâminas foram

submersas numa sequência de dois boréis contendo etanol absoluto por 5 minutos cada, com agitação constante. Na etapa seguinte, as lâminas foram incubadas em 2 x SSC, pH 7,0 por 25 minutos a 75°C e depois sofreram um tratamento com pepsina (pepsina 0,4%, NaCl 0,9% e HCl 0,02N) para remover o excesso de citoplasma das células. Para cada lâmina, foi pipetado 500µL de pepsina sobre o corte histológico, coberto com uma lamínula plástica 20 x 50 mm. A lâmina então foi levada a uma caixa úmida, a 37°C, por 25 minutos. Após este tempo, a lamínula foi retirada e descartada. A lâmina com o corte foi imersa em borel com 2 x SSC por 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida passada em uma sequência de três boréis com diferentes concentrações de etanol, 70%, 85% e 100%, obedecendo esta ordem. A lâmina foi seca em temperatura ambiente e, assim, seguiu para hibridização.

3.2.6- Hibridização

A lâmina com o corte histológico foi submersa em um borel contendo a solução desnaturante (70% formamida / 2xSSC) a 73°C, por 5 minutos. Em seguida submersa em boréis contendo etanol 70%, 85% e 100%. Depois foram secas em temperatura ambiente e mantidas a 45°C.

A sonda preparada num volume final de 10µL, foi desnaturada a 73°C por 5 minutos e pipetada sobre a região previamente marcada da lâmina alvo desnaturada. Uma lamínula 24 x 40 mm foi utilizada para cobrir a sonda. A lamínula foi selada à lâmina com cola plástica (Cola Vinil, Brascola).

A lâmina com a sonda foi colocada em laminário plástico, onde no fundo foram colocados papéis absorventes umedecidos com soro fisiológico estéril e levados à estufa a 37°C, por 72 horas, para a hibridização.

3.2.7- Lavagem

Após hibridização, a lâmina foi lavada para a retirada de hibridizações inespecíficas. A lamínula foi removida e a lâmina, então, submersa em uma sequência de três boréis com a primeira solução de lavagem, 50% formamida / 2 x SSC, na temperatura

de 45°C, durante 5 minutos cada. A seguir a lâmina foi submersa em 2 x SSC, por 5 minutos a 45°C e depois em 2 x SSC / *tween 20* 0,05% por 3 minutos a 45°C. Em seguida a lâmina foi lavada em PBS 1 x e submersa em uma sequência de etanol 70%, 85% e 100%. Secou-se a lâmina em temperatura ambiente e a ela foram adicionados 10 µL do corante de fundo *DAPI* (Glicerina contendo 4',6'-diamidino-2-phenylindole 0,5µg/mL; 1,4-diazobicyclo (2.2.2) octane 2%, ambos reagentes da *Sigma Chemical*), observando sempre o local onde está o tecido tumoral. Sobre o corante colocou-se uma lamínula 24 x 40 mm. Após 10 minutos a 4°C, as lâminas com metáfases hibridizadas foram analisadas no microscópio de fluorescência.

3.2.8- Captura da imagem do *FISH*

As imagens dos núcleos foram capturadas no microscópio de fluorescência (Olympus BX51) com lâmpada de mercúrio de 100W, equipado com uma roda onde estão dispostos os filtros *DAPI* (4',6-Diamidino-2-phenylindole), *FITC* (Fluorescein isothiocyanate) e *TRICT* (Tetramethyl rhodamine isothiocyanate). Para a captura do *FISH* utilizando as sondas *LSI P53* e *LSI (RBI)* são utilizados somente os filtros *DAPI* e *TRICT*. O microscópio possui um sistema captura de imagem acoplado, composto por uma câmera monocromática de resolução 768 x 575 pixel (CCD COHU mod. 4912-5010/0000) e um computador PC – *Pentium*, com *Windows NT 4.0* com *software* para análise de cariótipos, *FISH* e *CGH* (Sistema *CytoVision* – *Applied Imaging*).

3.2.9- Análise das imagens do *FISH*

De cada campo observado foram capturadas duas imagens, uma corada com *DAPI*, outra com *TRICT*. Da imagem corada com *DAPI* identificou-se os núcleos interfásicos. A imagem capturada com *TRICT* é específica para a marcação do genes estudados, pois as duas sondas, são marcadas com *SpectrumRed* (vermelho). Com relação a interpretação, na célula normal são encontrados duas marcações vermelhas que representam os dois alelos dos genes, enquanto na célula com deleção somente um sinal vermelho é observado (Figura 10).

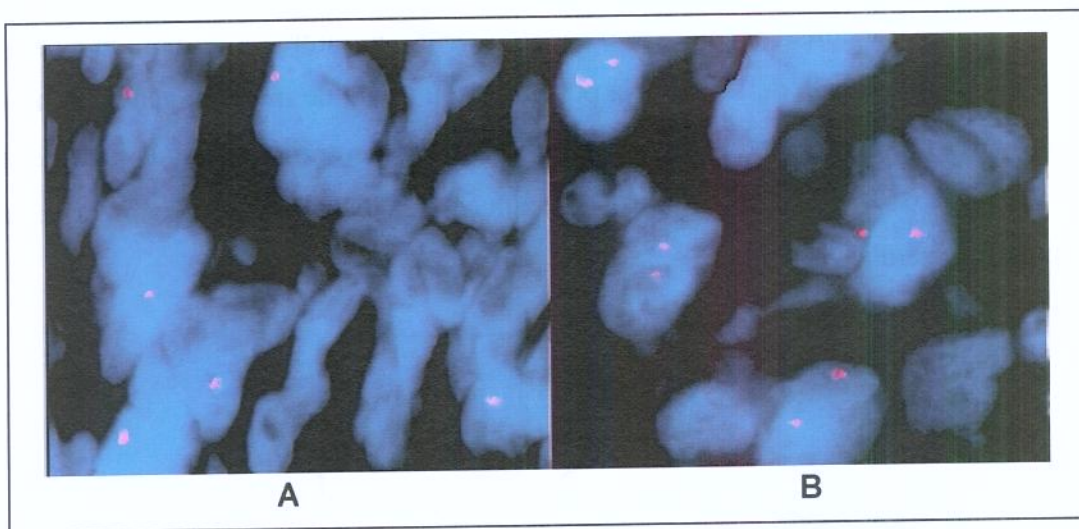


Figura 10- Imagens de núcleos interfásicos de cortes histológicos tumorais hibridizados com sonda para pesquisa do gene *P53*. **A)** Núcleos interfásicos apresentando deleção, apenas um sinal vermelho é observado (seta). **B)** Núcleos interfásicos normais, presença de dois sinais vermelhos.

3.3- Metodologia para a realização da técnica de Hibridização Genômica Comparativa (CGH)

3.3.1- Princípio da Técnica do CGH

Esta técnica usa estratégia de hibridização reversa, e consiste na extração de DNA tumoral a ser estudado e DNA normal para controle, seguida da marcação de ambos com fluorocromos diferentes. Após a extração, o DNA genômico de célula tumoral é marcado com *SpectrumGreen* e o DNA genômico normal é marcado com *SpectrumOrange*. A seguir, os dois são co-hibridizados em metáfases normais. Como resultado obtém-se uma coloração padrão em todos os cromossomos. Mediante a presença de desequilíbrios no DNA teste, verifica-se maior ou menor representação de uma das cores, o que permite, através da análise com um *software* apropriado, identificação de perdas e/ou ganhos no DNA tumoral (WOLF, 1996).

Esta técnica permite a detecção de desequilíbrios cromossômicos, isto é, alteração da quantidade de DNA, seja por ganho ou perda de material genético, não sendo capaz de detectar translocações equilibradas. Assim, ao contrário do estudo por citogenética convencional, o DNA teste é estudado, sem a necessidade da obtenção de metáfases através de cultura de células.

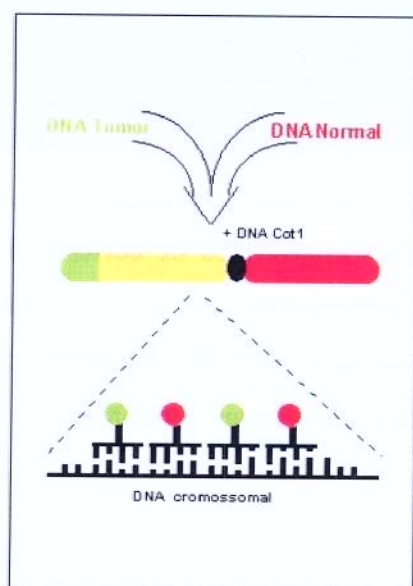


Figura 11- Representação esquemática do método de *CGH*. Quantidades equivalentes de DNA tumoral marcado com fluorocromo verde e DNA normal marcado com fluorocromo vermelho, são hibridizados com metáfases normais. Esta lâmina hibridizada é levada ao microscópio de fluorescência e a captura fornece os seguintes resultados: DNA normal, amarelo; ganho de DNA tumoral, verde; perda de DNA tumoral, vermelho.

3.3.2- DNA para *CGH* - Sonda

O DNA genômico tumoral é extraído utilizando digestão com Proteinase K e depois tratado com fenol-clorofórmio (24:1), e precipitado com etanol absoluto. (MANIATIS, 1989). O DNA extraído é submetido à reação de *Nick translation*, utilizando como marcador um nucleotídeo *FITC-dUTP* (*SpectrumGreen*, *Vysis-Downers Grove, IL, USA*). Para DNA normal utilizado foi o DNA de referência (masculino ou feminino) marcado com *SpectrumRed* (*Vysis-Downers Grove, IL, USA*).

3.3.3- Preparo do DNA genômico tumoral para o *Nick translation*

O DNA extraído foi novamente suspenso em tampão 1xTBE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8,5). Sua concentração foi verificada ao Espectrofotômetro UV-Vis (Eppendorf AG, 22331, Hamburg). A partir deste dado foi realizada uma diluição para o *Nick translation*, de modo que sua concentração final na reação fosse de 1 µg/µL.

3.3.4- *Nick translation*

Para marcação do DNA tumoral com o *SpectrumGreen* foi realizada a reação de *Nick translation*. Esta reação é um processo de replicação de DNA que utiliza uma enzima com atividade endonucleásica que insere pequenos cortes na cadeia de fosfatos do DNA (os chamados *nicks*). Estes cortes criam automaticamente extremidades 3'-OH, que servirão de apoio para que a DNA polimerase. A partir dos *nicks*, a DNA polimerase sintetiza pequenos trechos de DNA, apoiando-se nas extremidades 3'-OH criadas pelos *nicks*. Durante esta síntese a DNA polimerase acaba utilizando aleatoriamente os nucleotídeos, dTTP e o nucleotídeo FITC-dUTP, presentes no meio reacional. Ao término desta etapa a DNA polimerase produz uma série de fragmentos e reconstitui, em fita dupla o DNA marcado.

Para reação de *nick translation* foi utilizado o kit da *Vysis-Downers Grove, IL, USA* (Cat. No. 32-801024), seguindo o protocolo do fabricante. Para cada tubo de reação foram adicionados os seguintes reagentes e sua concentração final, respectivamente, para um volume final de 50µL: *SpectrumGreen* dUTP 0,2nmol/µL, dTTP 0,015mM/µL, dATP 0.1mM, dCTP 0.1mM e dGTP 0.1mM, 10X *nick translation buffer* (500mM Tris-HCl, pH7,2, 100mM MgSO₄, 1 mM DDT) 1X e 10µL da mistura de enzimas do *nick translation* (DNA polimerase I, Dnase I, diluídas em 50% de glicerol, 50mM Tris-HCl, pH 7,2, 10mM MgSO₄, 0,1 mM DDT e 0,5 mg/mL de *nuclease-free* BSA). O volume foi completado com água isenta de nucleases.

A reação foi incubada por 2 horas a 15°C (temperatura ótima de ação das enzimas) e, a seguir foram inativadas por 10 minutos em banho a 70°C. O tubo foi mantido a 0°C. Após reação, o tamanho da sonda marcada foi avaliado através de uma eletroforese,

utilizando gel de agarose 1% (10cm x 6,5cm), corado com brometo de etídeo 10µg/ml, na concentração final de 0,01% (v/v). As amostras foram preparadas para correr no gel, utilizando 9µL do DNA marcado e 1µL de 6 x tampão de corrida (0,05% azul de bromofenol, 10% glicerol, TBE 6x). Foi utilizado como marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen, life technologies*). A corrida foi realizada com tampão TBE 1x (Tris borato 90mM, pH 8,3 / EDTA 2mM), utilizando corrente de 100mA, até que o azul de bromofenol ficasse de 2 a 3 cm do final do gel.

O gel de eletroforese é uma etapa muito importante, pois através dele podemos avaliar o tamanho dos fragmentos de DNA marcado após a reação de *nick translation*. O ideal para a realização do *CGH* é que os fragmentos estejam entre 200 a 1000 pb (Figura 12).

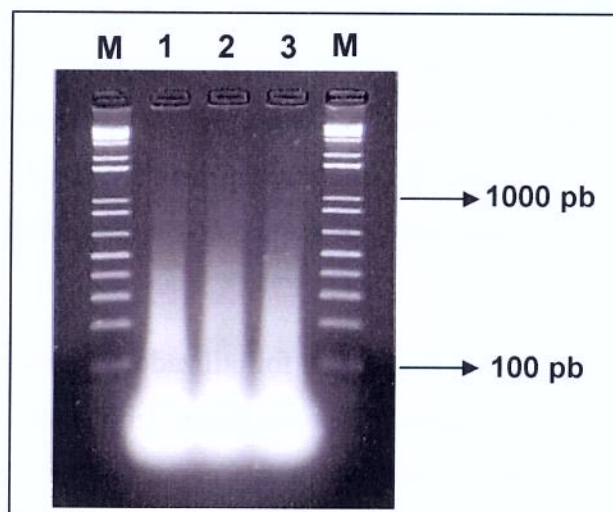


Figura 12- Foto de um gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 10µg/ml na concentração final de 0,01% (v/v), submetido a eletroforese, com amostras de DNA tumoral, após reação de nick translation. **1, 2 e 3**, amostras de DNA tumoral após reação. **M**, marcador de peso molecular de 1Kb. Comparativamente, através do gel, estima-se o tamanho da sonda.

3.3.5- Controles e lâminas utilizadas no CGH

Os controles positivos e negativos fornecem comparações na avaliação da hibridização e interpretação dos dados do CGH. Para controles negativos foram utilizados DNA de referência masculino normal, marcados com *SpectrumGreen* (*Vysis-Downers Grove, IL, USA*, Cat. 32-804024) e *SpectrumRed* (*Vysis-Downers Grove, IL, USA*, cat. 32-802024). O perfil de intensidade para este experimento foi dentro dos limites de valores como determinado pela análise da imagem. Para controle positivo foi utilizado o DNA controle positivo (*Vysis-Downers Grove, IL, USA*, cat. 32-800227) que é extraído de células provenientes de linhagens celulares onde as aberrações genéticas já são conhecidas e são facilmente detectadas pelo CGH.

Foram utilizadas lâminas com metáfases normais (*Vysis-Downers Grove, IL, USA*, Cat. N°30-806010). Estas lâminas são preparadas utilizando células normais, linfócitos em metáfases, e são otimizadas para o teste de CGH, utilizando culturas de linfócitos normais, estimuladas com fitohemaglutinina, por 72 horas. O padrão de cromossomo deve ter de 400 a 550 bandas. Os linfócitos são derivados do sangue de doador masculino, cariotipicamente normal.

3.3.6- Co-precipitação dos DNA tumoral e normal — Sonda

A Co-precipitação foi realizada com o intuito de, numa mesma sonda, existirem quantidades iguais de DNA tumoral marcado com *SpectrumGreen* e DNA normal marcado com *SpectrumRed*, além do *Human Cot-1 DNA* (*Invitrogen, life technologies*), cuja função é minimizar hidridização da sonda com DNA repetitivo, como as famílias *AluI* e *Kpml*, nas técnicas *in situ*. Isto faz com que diminua a hibridização inespecífica no DNA alvo (metáfases). Como a sonda marcada com *SpectrumRed* produz sinal de intensidade maior, deve-se tentar igualar os sinais, aumentando a quantidade de sonda marcada com *SpectrumGreen*. Para combinar as duas, foram utilizados 20ng do DNA tumoral marcado com *SpectrumGreen*, 100 µg do *Human Cot-1 DNA* e 1ng do DNA de referência masculino, quando o tumor estudado for de um paciente do sexo masculino, ou DNA de

referência feminino, quando o tumor estudado pertencia a uma paciente do sexo feminino, marcado com *SpectrumRed*. Este *mix* de DNA foi precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada e mantida em gelo por 15 minutos para auxiliar a precipitação da sonda. Centrifugou-se o tubo por 30 minutos a 10.000g, em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e a sonda precipitada foi secada a temperatura ambiente. Ressuspendeu-se a sonda com 3µL de água destilada estéril e 7µL de tampão de hibridização para CGH (*Vysis-Downers Grove, IL, USA*) e depois mantida a -20°C até o momento de uso.

3.3.7- Hibridização

Como o volume de sonda utilizado foi suficiente para cobrir somente uma parte da lâmina alvo (lâminas com as metáfases normais - *Vysis-Downers Grove, IL, USA*, Cat. N°30-806010), uma área central foi escolhida e marcada com caneta diamante. Para a desnaturação, a lâmina foi submersa em um borel contendo a solução desnaturante (70% formamida / 2xSSC) a 73°C, por 5 minutos. Em seguida submersa em boréis contendo etanol 70%, 85% e 100%. Depois foram secas em temperatura ambiente e mantidas a 45°C.

A sonda preparada num volume final de 10µL, foi desnaturada a 73°C por 5 minutos e pipetada sobre a região previamente marcada da lâmina alvo desnaturada. Uma laminúla 24 x 40 mm foi utilizada para cobrir a sonda. A laminúla foi selada a lâmina cola plástica (Cola Vinil, Brascola).

A lâmina alvo com a sonda foi colocada em laminário plástico. No fundo deste laminário foram colocados papéis absorventes umedecidos com soro fisiológico estéril e levados à estufa a 37°C, por 72 horas, para a hibridização.

3.3.8- Lavagem

Após hibridização, a lâmina foi lavada para a retirada de hibridizações inespecíficas. A laminúla foi removida e a lâmina, então, colocada em um borel com a primeira solução de lavagem, 0.4X SSC/0.3% NP-40, na temperatura de 74°C, durante

2 minutos. A seguir a lâmina foi submersa na segunda solução de lavagem, 2X SSC/0.1% NP-40, em temperatura ambiente, por 1 minuto. Secou-se a lâmina em temperatura ambiente e a ela foram adicionados 10 µL do corante de fundo *DAPI II* (Glicerina contendo 4'6'-diamidino-2-phenylindole 0,5µg/mL; 1,4-diazobicyclo(2.2.2)octane 2%, ambos reagentes da *Sigma Chemical*), observando sempre o local marcado previamente na hibridização. Sobre o corante colocou-se uma lamínula 24 x 40 mm, e depois de aguardar 10 minutos a 4°C, as lâminas com metáfases hibridizadas foram analisadas no microscópio de fluorescência.

3.3.9- Captura da imagem do CGH

As imagens das metáfases foram capturadas no microscópio de fluorescência (Olympus BX51) com lâmpada de mercúrio de 100W, equipado com uma roda onde estão dispostos os filtros *DAPI* (4',6-Diamidino-2-phenylindole), *FITC* (Fluorescein isothiocyanate) e *TRICT* (Tetramethyl rhodamine isothiocyanate). O microscópio possui acoplado um sistema captura de imagem composto por uma câmera monocromática de resolução 768 x 575 pixel (CCD COHU mod. 4912-5010/0000) e um computador PC – Pentium, com Windows NT 4.0 com software para análise de cariotipagem, *FISH* e *CGH* (Sistema CytoVision – Applied Imaging).

3.3.10- Análise das imagens do CGH

Para cada caso foram capturadas no mínimo vinte metáfases. De cada metáfase encontrada, foram capturadas três imagens, uma corada com *DAPI*, outra com *FITC* e outra com *TRICT*. A imagem corada com *DAPI* permitiu a identificação de cada cromossomo, por analogia à banda G, para montagem do cariótipo. A imagem capturada com *FITC* é a imagem resultante da hibridização da metáfase com o DNA tumoral marcado com *SpectrumGreen* (verde). A imagem capturada com *TRICT* é resultante da hibridização da metáfase com o DNA normal marcado com *SpectrumRed* (vermelho).

O *software* atua nas imagens capturadas, atribuindo cores às imagens correspondendo ao filtro utilizado na captura, sendo que para *DAPI*, *FITC* e *TRICT* são atribuídas as cores azul, verde e vermelho, respectivamente. Além de cruzar as imagens capturadas em *TRICT* (DNA normal) e *FICT* (DNA tumoral), o *software* processa uma razão, sendo de 0,75 em *TRICT* para 1,25 em *FICT* (Figura 13). O cruzamento das imagens gera uma nova cor, a amarela, que representa equilíbrio entre os DNA hibridizados, portanto esta cor admite que o DNA tumoral está normal. Caso haja predomínio da cor verde, ocorreu uma maior hibridização de DNA tumoral, portanto um ganho gênico. Do mesmo modo, havendo predomínio da cor vermelha, ocorreu uma menor hibridização de DNA tumoral, portanto uma perda gênica.

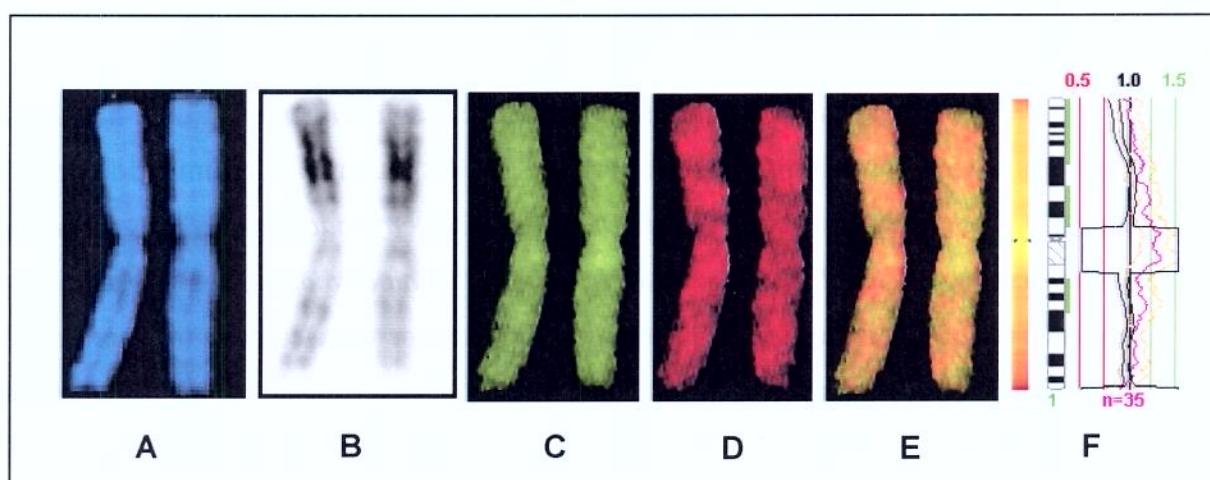


Figura 13- Imagens do *CGH* com representações gráficas. **A)** *DAPI*; **B)** *DAPI* invertido; **C)** *FITC* – Hibridização com DNA tumoral; **D)** *TRICT* – Hibridização com DNA normal; **E)** Imagem cruzada *FITC* x *TRICT* – Razão e **F)** Perfil oferecido pelo *software* para análise de ganhos e perdas gênicas.

Após estabelecida a razão de 1,25 para o verde e de 0,75 para o vermelho, a metáfase captura em *DAPI*, sofrendo uma inversão de contraste pelo *software*. Isso permite que os cromossomos sejam dispostos em um cariógrama. Foi determinado o eixo de cada cromossomo, e por fim foram calculados os perfis de cada um, com intervalo de confiança de 95%.

Como o tecido do tumor e o DNA normal não são analisáveis por sexo, os cromossomos X e Y foram excluídos da análise estatística. O teste Binomial foi realizado para detectar, as tendências em ocorrer ou não, as anormalidades cromossômicas em cada um dos 22 cromossomos e, nos genes *RB1* e *P53*.

Os testes Qui-quadrado e exato de FISHER foram utilizados na análise estatística deste estudo.

A sobrevida livre de eventos (SLE) e a sobrevida global (SG) foram calculadas de acordo com o método de Kaplan-Meier (KAPLAN, MEIER, 1958). Para a análise estatística, os pacientes foram analisados a partir do momento do diagnóstico até a progressão da doença, ou recaída, ou morte por qualquer causa para a sobrevida livre de eventos, e até a morte, na análise da sobrevida global.

4- RESULTADOS

No período de janeiro de 1999 até outubro de 2005 foram registrados no Centro Infantil Boldrini 52 pacientes com o diagnóstico de osteossarcoma. Foram excluídos desta análise 11 pacientes, pela não obtenção de material de biópsia de tumor congelado em nosso banco de tumor, para a extração de DNA.

Dos 41 pacientes incluídos neste estudo, 24 eram do sexo feminino e 17 do sexo masculino, numa proporção de 1,4:1 (Tabela 1, Figura 14). A maioria foi da raça branca e apenas 6 pacientes eram não brancos (2 pacientes negros e 4 pardos; Tabela 2, Figura 15). Houve o predomínio da raça branca ($p = 0,0001$).

Tabela 1- Distribuição da frequência, absoluta (n) e relativa (%), do sexo dos pacientes com osteossarcoma. comparação pelo teste qui-quadrado de uma amostra ($\alpha = 0,05$)

SEXO	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Feminino	24	58,5
Masculino	17	41,5
TOTAL	41	100,0
Qui-quadrado	$\chi^2 = 1,20$	p = 0,27

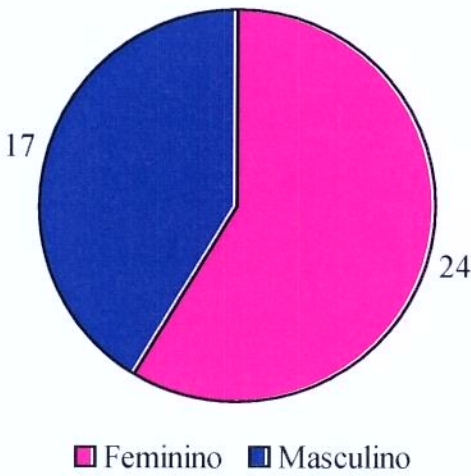


Figura 14- Distribuição da frequência dos pacientes com osteossarcoma, quanto ao sexo.

Tabela 2- Distribuição da frequência, absoluta (n) e relativa (%), da cor dos pacientes com osteossarcoma. Comparação pelo teste qui-quadrado de uma amostra ($\alpha = 0,05$)

COR	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Branco	33	80,5
Não Branco	8	19,5
TOTAL	41	100,0
Qui-quadrado	$\chi^2 = 15,24$	$p = 0,0001^*$

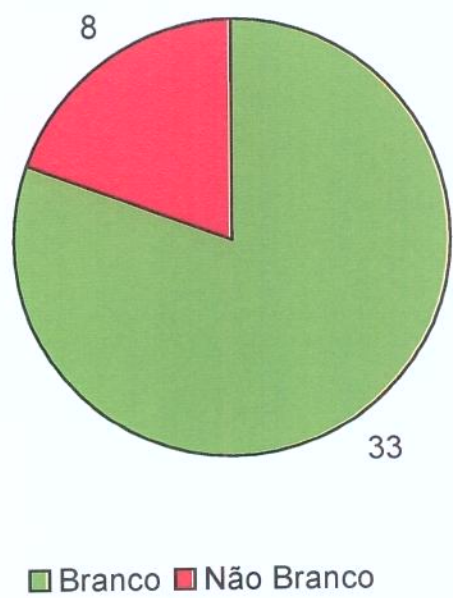
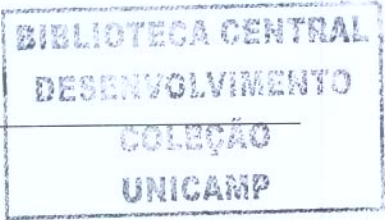


Figura 15- Distribuição da frequência dos pacientes com osteossarcoma quanto à raça.



A faixa etária de maior prevalência nos pacientes do estudo ficou entre 6 e 14 anos de idade . Ao diagnóstico, 32 crianças tinham menos de 14 anos de idade (78%), com mediana de 12,4 anos (Tabela 3, Figura 16). Oito pacientes apresentavam-se entre 15 e 18 anos (19,5%) e apenas 1 paciente tinha mais de 19 anos, ao diagnóstico (Tabela 4, Figura 17).

Tabela 3- Estatística descritiva da idade (em anos) dos pacientes com osteossarcoma, por ocasião do diagnóstico

	IDADE (ANOS)
M	12,4
DP	3,4
EPM	0,5
MAX	22
MIN	6
N	41

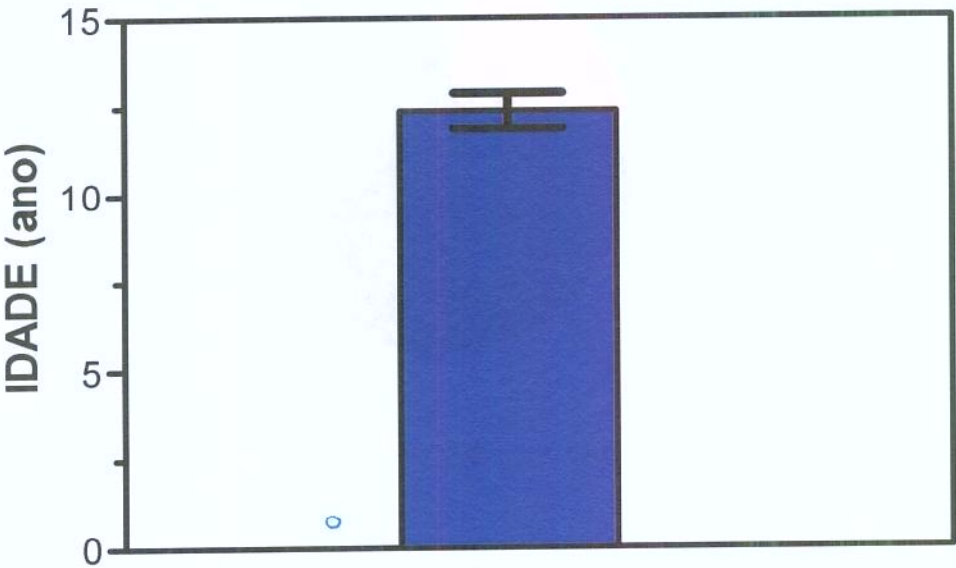


Figura 16- Idade (em anos) dos pacientes com osteossarcoma, por ocasião do diagnóstico.

Tabela 4- Distribuição da frequência, absoluta (n) e relativa (%), dos pacientes com osteossarcoma segundo a faixa etária (em anos) por ocasião do diagnóstico, comparação pelo teste qui-quadrado de uma amostra ($\alpha = 0,05$)

FAIXA ETÁRIA (ano)	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
— 14	32	78,0
>14 — 18	8	19,5
>18 — 22	1	2,5
TOTAL	41	100,0
Qui-Quadrado	$\chi^2 = 38,67$	$p \cong 0,00^*$

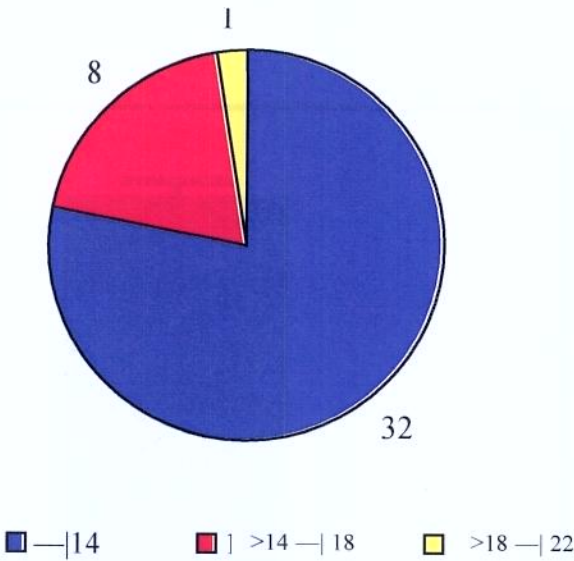


Figura 17- Distribuição da frequência dos pacientes com osteossarcoma segundo a faixa etária (em anos), ao diagnóstico.

Quanto à localização do tumor ao diagnóstico, a maioria foi em ossos longos de membros inferiores ($p=0,003$). Dezoito pacientes apresentaram-se com comprometimento pelo tumor em região de fêmur (44%), 11/41 em tíbia (26,8%) , 9 em úmero (22%), 1 em rádio, 1 em região sacroilíaca e 1 em calcâneo (7,2%), Tabela 5, Figura 18.

Dezoito dentre os 41 pacientes apresentavam-se ao diagnóstico com metástase pulmonar e, 23 pacientes eram não metastáticos (Tabela 6, Figura 19).

Tabela 5- Distribuição da frequência, absoluta (n) e relativa (%), dos osteossarcomas segundo a localização anatômica. comparação pelo teste de qui-quadrado de uma amostra (mi ↔ outros) ($\alpha = 0,05$)

LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Fêmur	18	44,0
Tíbia	11	26,8
Úmero	9	22,0
Rádio	1	2,4
Sacroilíaco	1	2,4
Calcâneo	1	2,4
TOTAL	41	100,0
Qui-Quadrado	$\chi^2 = 8,80$	p = 0,003*

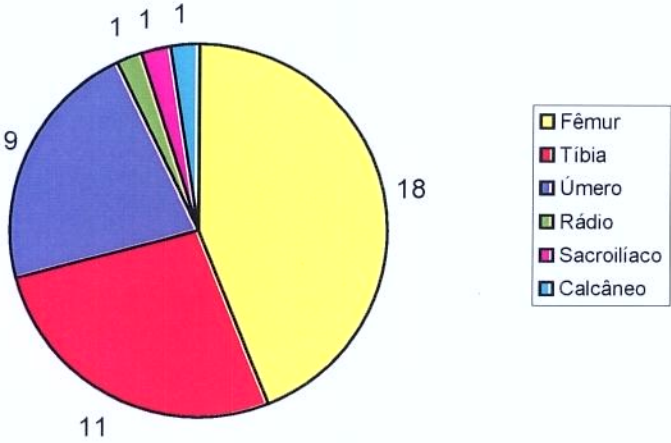


Figura 18- Distribuição da frequência dos osteossarcomas, segundo a localização anatômica.

Tabela 6- Distribuição da frequência, absoluta (n) e relativa (%), dos pacientes com osteossarcoma, segundo o estadiamento. comparação pelo teste qui-quadrado de uma amostra ($\alpha = 0,05$)

ESTADIAMENTO	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Não metastático	23	56,4
Metastático	18	43,6
TOTAL	41	100,0
Qui-quadrado	$\chi^2 = 0,61$	p = 0,43

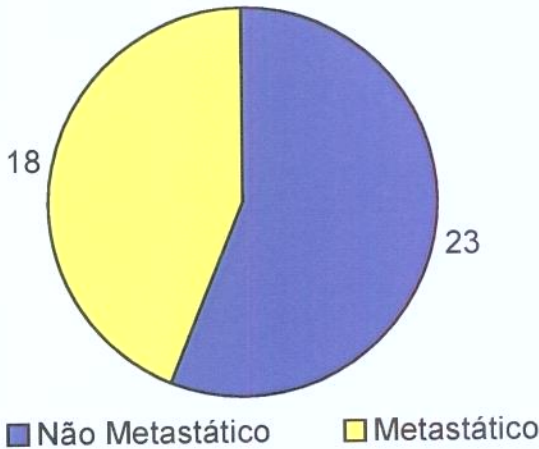


Figura 19- Distribuição de frequência dos pacientes com osteossarcoma, segundo a presença de metástases.

Quanto ao subtipo histológico, o osteoblástico foi o mais freqüente, ocorrendo em 85,4% dos casos ($p= 0,000006$), seguido pelo subtipo histológico condroblástico em 5/41 casos (12,2%) e apenas um paciente era do subtipo teleangiectásico (Tabela 7, Figura 20).

Tabela 7- Distribuição da frequência, absoluta (n) e relativa (%), dos pacientes com osteossarcoma, segundo o tipo histológico. Comparação pelo teste qui-quadrado de uma amostra (osteoblástico ↔ outros) ($\alpha = 0,05$)

TIPO HISTOLÓGICO	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Osteoblástico	35	85,4
Condroblástico	5	12,2
Teleangiectásico	1	2,4
TOTAL	41	100,0
Qui-quadrado	$\chi^2 = 20,51$	$p = 0,000006^*$

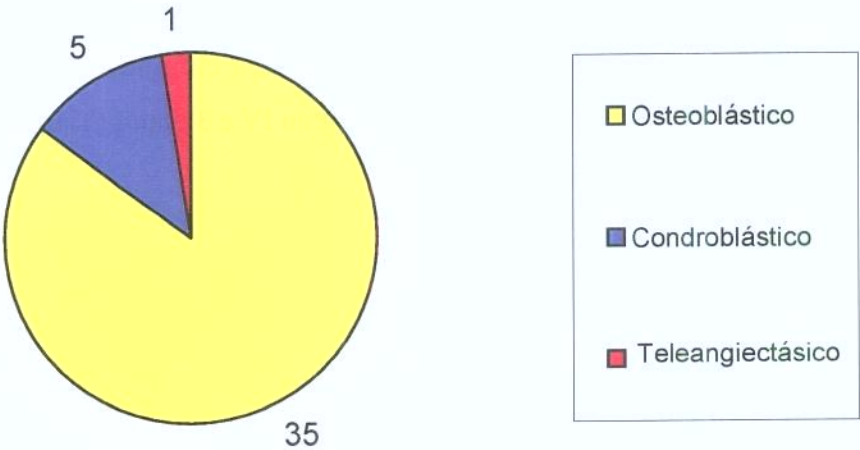


Figura 20- Distribuição da frequência dos pacientes com osteossarcoma, segundo o tipo histológico.

Como parte da terapêutica empregada para o tratamento do osteossarcoma, a cirurgia do tumor deveria ser realizada entre as semanas 11 e 12 do protocolo quimioterápico. O objetivo desta estratégia visava a redução do tumor, facilitando sua ressecabilidade, como também, avaliar a resposta do tumor ao esquema quimioterápico utilizado através do grau de necrose no exame anatomopatológico, segundo os critérios de HUVOS. Em 80,6% dos pacientes a cirurgia conservadora foi realizada, com colocação de endopróteses e/ou enxertias ($p=0,0002$), 7 pacientes foram amputados (19,4% dos casos) e 5 não realizaram cirurgia. Dois pacientes faleceram com progressão do tumor antes do momento cirúrgico (casos 27 e 30). Dois foram a óbito por nefrotoxicidade após o uso de methotrexate (casos 2 e 21). Um paciente faleceu por sepse durante o período de neutropenia febril (caso 25). Todos os óbitos ocorreram antes das semanas 11 e 12 do protocolo terapêutico (Tabela 8, Figura 21). Os 36 pacientes que foram submetidos a cirurgia do tumor primário, tiveram o material cirúrgico avaliado histopatologicamente. Dezoito pacientes tiveram grau III de necrose na peça cirúrgica segundo os critérios de HUVOS ($p=0,002$), 10 casos tiveram grau II, 5 grau IV e 3 grau I (Tabela 9, Figura 22).

Tabela 8- Distribuição da frequência, absoluta (n) e relativa (%), dos pacientes com osteossarcoma, segundo a cirurgia realizada. Comparação pelo teste qui-quadrado de uma amostra ($\alpha = 0,05$)

CIRURGIA REALIZADA	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Conservadora	29	80,6
Amputação	7	19,4
TOTAL	36 ¹	100,0

¹ cirurgia não realizada em 5 pacientes

Qui-quadrado $\chi^2 = 13,44$ $p = 0,0002^*$

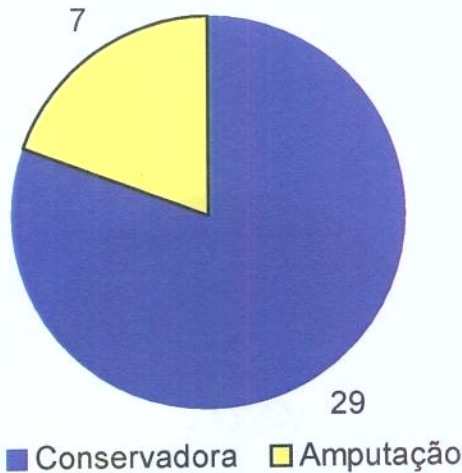


Figura 21- Distribuição da frequência dos pacientes com osteossarcoma, segundo a cirurgia realizada.

Tabela 9- Distribuição da frequência, absoluta (n) e relativa (%), dos pacientes com osteossarcoma, segundo o grau de necrose na peça cirúrgica (huvos). Comparação pelo teste qui-quadrado de uma amostra ($\alpha = 0,05$)

GRAU DE NECROSE (HUVOS)	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
I	3	8,3
II	10	27,8
III	18	50,0
IV	5	13,9
TOTAL	36¹	100,0

¹ cirurgia não realizada em 5 pacientes

Qui-quadrado $\chi^2 = 14,89$ p = 0,002*

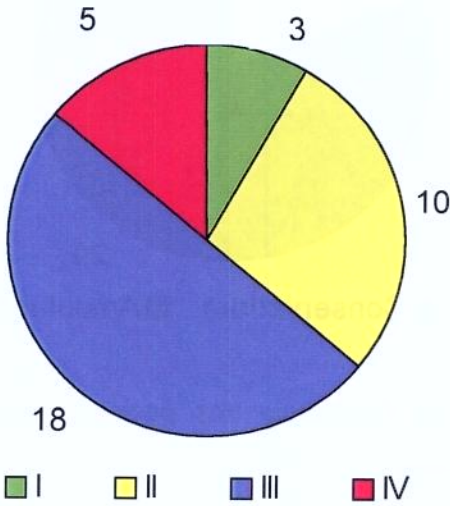


Figura 22- Distribuição da frequência dos pacientes com osteossarcoma, segundo o grau de necrose da peça cirúrgica.

Vinte e oito pacientes estão vivos. Dezessete (41,5%) em remissão clínica completa, fora de terapia. Nove pacientes estão em terapia, após realização de cirurgia, sem atividade de doença. Dois pacientes estão vivos com progressão do tumor em pulmão (casos 15 e 32). Treze pacientes deste estudo foram a óbito (6 por sepse, 5 por progressão de tumor e 2 por nefrotoxicidade à quimioterapia), Tabela 10, Figura 23. Duas meninas tiveram o diagnóstico de Leucemia Mielóide Aguda após o tratamento do osteossarcoma (casos 22 e 36). O caso nº 22, 11 meses após o término da terapia para osteossarcoma, faleceu por sepse antes de reiniciar a quimioterapia para tratar a leucemia e, o caso nº 36, teve diagnóstico de Leucemia Mielóide Aguda, 2 anos após o término da terapia do osteossarcoma, sendo submetida a novo esquema quimioterápico, seguido de transplante de medula óssea alogênico, falecendo 3 meses após este procedimento, por sepse.

Tabela 10- Distribuição da frequência, absoluta (n) e relativa (%), dos pacientes com osteossarcoma, segundo a condição atual do paciente (avaliação em dezembro de 2005). Comparação pelo teste qui-quadrado de uma amostra (vivo ↔ óbito) ($\alpha = 0,05$)

SITUAÇÃO ATUAL	FREQUÊNCIA	
	Absoluta (n)	Relativa (%)
Óbito por Seps	6	14,6
Óbito por Progressão do Tumor	5 ¹	12,2
Óbito por Nefrotoxicidade à Quimioterapia	2	4,9
Vivo em Remissão Clínica Contnua	17	41,5
Vivo em Terapia	9	22,0
Vivo com Tumor	2	4,9
TOTAL	41	100,0

¹ óbito decorrente do segundo tumor em um paciente

Qui-quadrado

$\chi^2 = 4,33$

$p = 0,04^*$

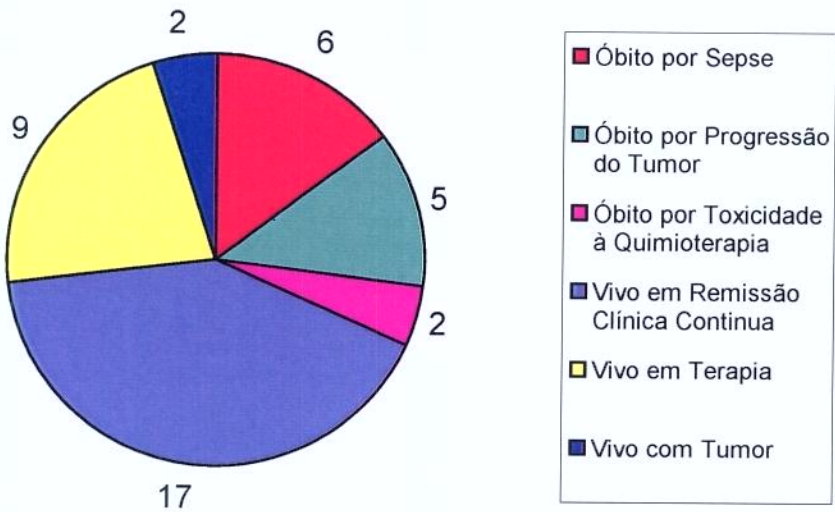


Figura 23- Distribuição da frequência dos pacientes com osteossarcoma, segundo a condição atual do paciente (avaliação em dezembro 2005).

Para a análise de Sobrevida Livre de Eventos foram considerados 41 pacientes. Em 7 anos de seguimento, a Sobrevida Global foi de $61,5\% \pm 0,8\%$ e a Sobrevida Livre de Eventos foi de $46,8\% \pm 1,0\%$, de acordo com o método de Kaplan-Meier (Figuras 24 e 25).

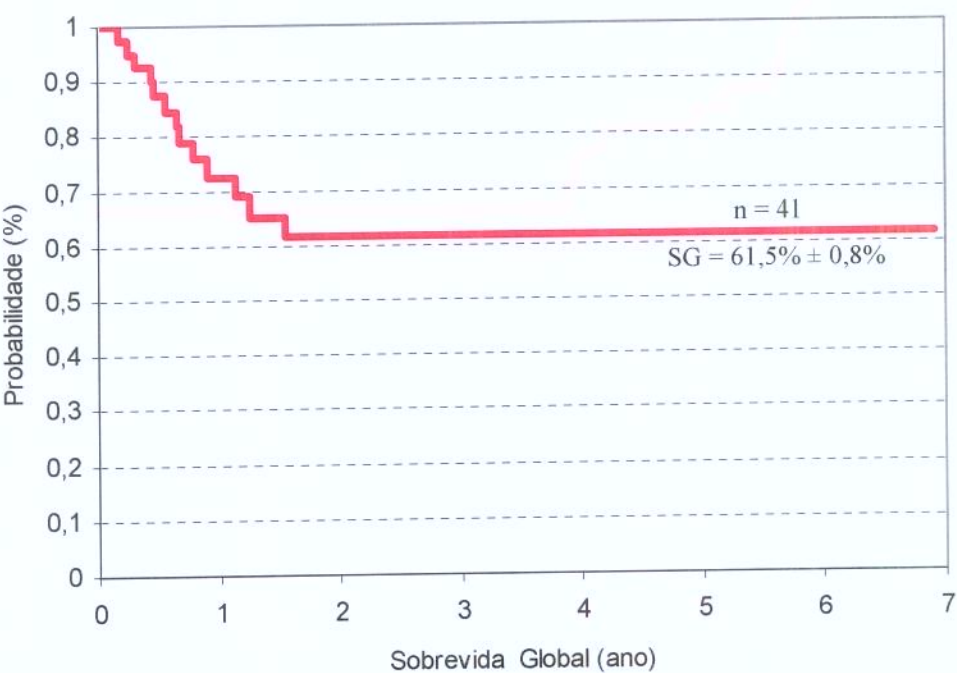


Figura 24- Sobrevida Global avaliada em 7, anos nos 41 pacientes portadores de Osteossarcoma.

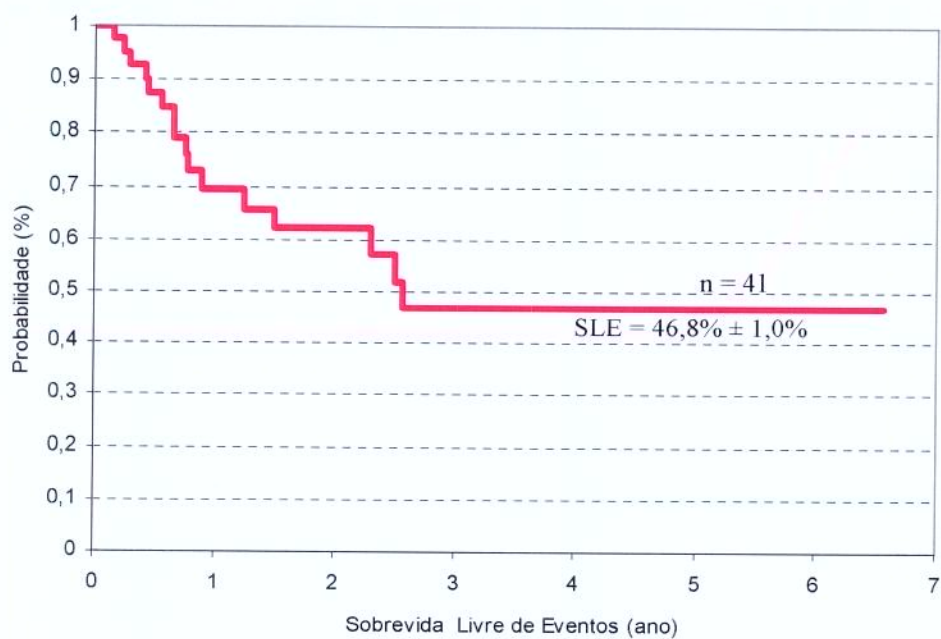


Figura 25- Sobrevida Livre de Eventos avaliada em 7 anos, nos 41 pacientes com Osteossarcoma.

Ao analisarmos os 23 casos não metastáticos, a Sobrevida Global foi de $75\% \pm 0,9\%$, em 7 anos de seguimento, e de $42\% \pm 1,3\%$, para os 18 casos metastáticos, de acordo com método de Kaplan-Meier (Figura 26).

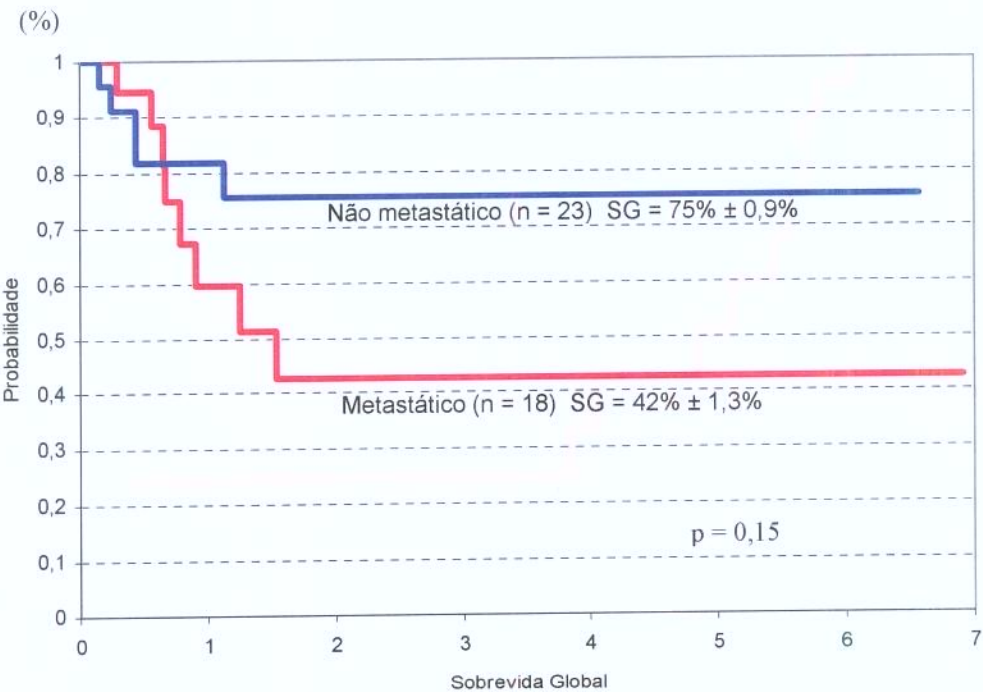


Figura 26- Sobrevida Global avaliada em 7 anos, dos 23 pacientes com Osteossarcoma não metastático comparativamente aos 18 pacientes com Osteossarcoma metastático ao diagnóstico.

A análise da Sobrevida Livre de Eventos, em 7 anos de acompanhamento, é de $65\% \pm 1,2\%$, nos pacientes não metastáticos e $25\% \pm 1,2\%$ nos pacientes metastáticos ($p=0,08$), Figura 27.

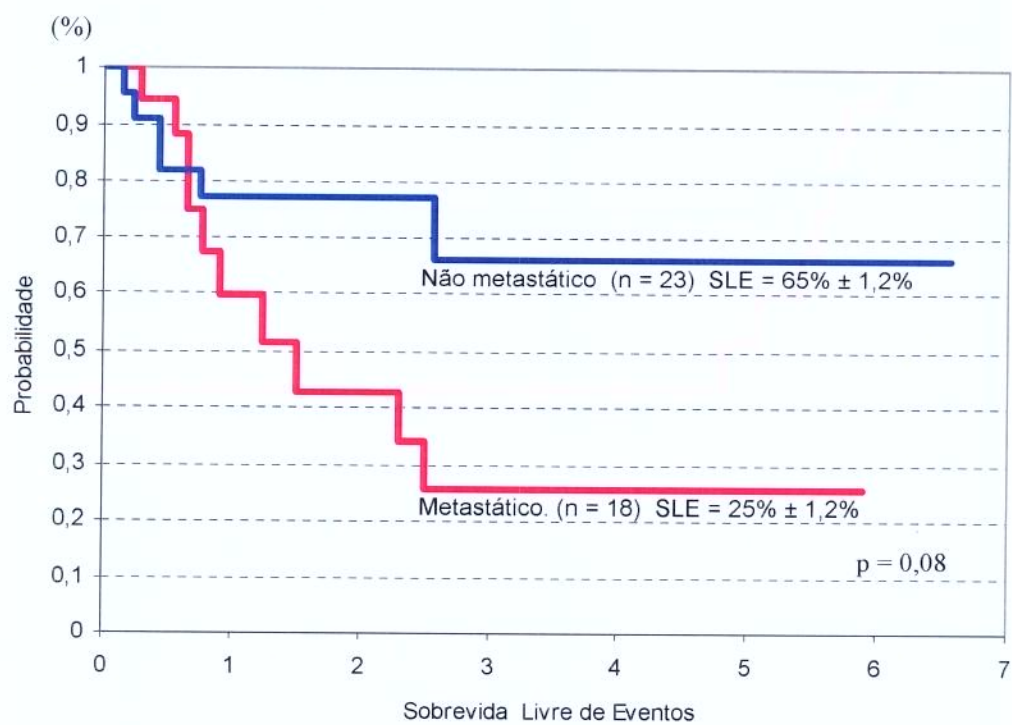


Figura 27- Sobrevida Livre de Eventos avaliada em 7 anos, nos 23 pacientes com Osteossarcoma não metastático comparativamente a 18 pacientes com Osteossarcoma metastático ao diagnóstico.

De acordo com o grau de necrose avaliado na peça cirúrgica, após 11 a 12 semanas de quimioterapia, dentre os 36 pacientes que foram operados, a sobrevida global para os pacientes que obtiveram grau I de necrose segundo os critérios de Huvos foi de $67\% \pm 2,7\%$, para grau II de necrose foi de $54\% \pm 2\%$, para grau III de necrose foi de $76\% \pm 1,2\%$, e para o grau IV de necrose foi de $80\% \pm 1,7\%$ em seguimento de 7 anos (Figura 28).

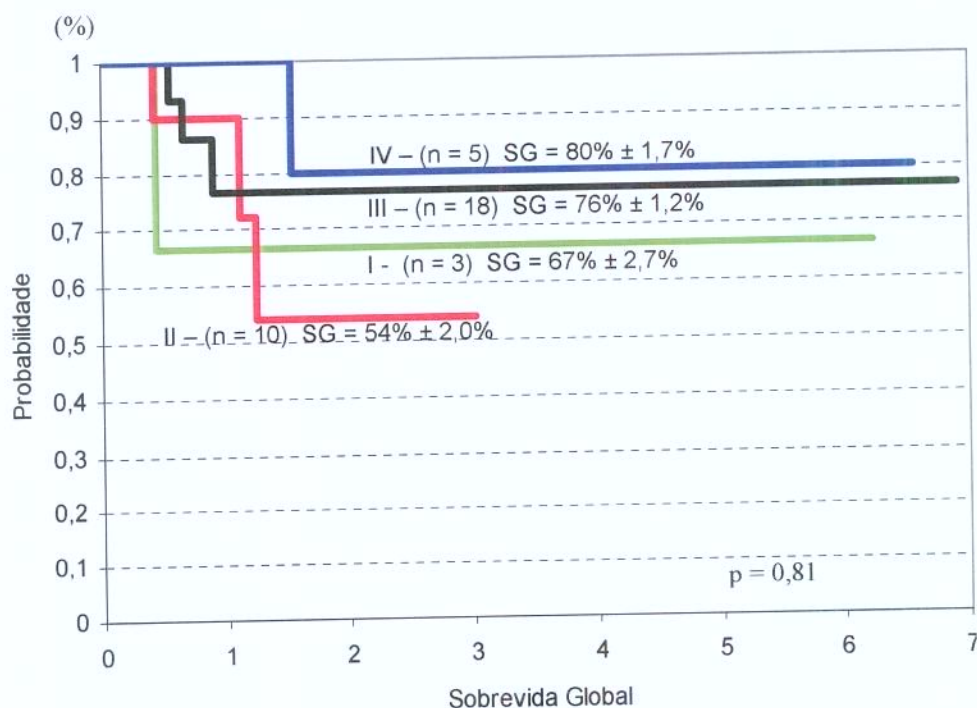


Figura 28- Sobrevida Global em 7 anos, de acordo com o Grau de Necrose (HUVOS) nos 41 pacientes com Osteossarcoma.

A análise citogenética dos 41 casos foi realizada em tecido fresco congelado de material do tumor, através da técnica de Hibridização Genômica Comparativa (CGH), Tabela 11. A pesquisa da deleção dos genes *P53* e *RBI* foi realizada pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), ANEXO II, em tecido de tumor extraído de bloco fixado em parafina, com cortes histológicos de 5 micras.

O teste Binomial foi realizado para detectar as tendências em ocorrer ou não, as anormalidades cromossômicas em cada um dos 22 cromossomos. E, em caso de ocorrer anormalidades, detectar se houve prevalência de amplificações e/ou deleções e em qual *locus* de cada cromossomo (Tabelas 12 e 13), aplicando-se os testes de qui-quadrado e exato de Fisher.

Tabela 11- Resultado CGH nos 41 pacientes com Osteossarcoma

CASO	CGH
1	+1p32~31, +2q21, + 6q16, + 12q12~13, -14q11.2 ~q12, -16p12~p11.2, -21q11.2~q21
2	+1q21~q32, +2q32~q35, +3p21~q27, +4q12~q31.3, -5q35, +6p21.3~q21, +8q23~qter, +10q24~qter, +11q13, +12q24, +13q22, -16p12~p11.2, -21q11.2, +22q12~qter +1p34.2~p13, +1q21~q41, +2p24~pter, +3q12~q13.1, +4q23~q26, +5p15.1~ter, +6p12~q12, +7q11.2, +8q24.1~qter, +11q14~qter, +12p11.2~p12, +12q14~q15, +13q21~qter, -16p13.1, +18p11.2~q22, -21q11.2~q21
3	+1q31, +2p23, +2q24, +3q23, +4p14~q13, +5q21~q34, +8q13, +8q23, +11q23~qter, +13q21~q32, -16p12~p13.1, +16q12.2~q13, +18q12~q22, -21q11.2~q21
4	+1p32~p33, +1q25~q31, +2q24~q35, +5p15.3, +6p21.1, +7p15~pter, +8q24.1~qter, +9q34, +11q23~qter, +13q33~qter, -14q11.2~q13, -16p11.2~q13.1, -21p11.2~q21
5	+6q14~q16, +6q23~q24, +11p15, -14q11.2, -15q11.2~q15, -16p11.2~p13.1
6	+2p23~pter, +3q12~q13.1, +8q24.2~qter, -9q13~q21, +10q25~qter, +12q24.3, -14q11.2~q13, -16p12, +17q24~qter, -21q11.2~q21
7	+1p13~pter, +1q23~q25, +2q37, +4q24, +11q24~qter, -17q23
8	+1, +2, +3, +4p13~p15.3, +4q, +5p13~pter, +5q, +6p12~p21.1, +6p22~p25, +6q, +7p13~pter, +7q, +8, +9p21~pter, +9q21~q32, +10p12~pter, +10q, +11p12~pter, +11q, +12p12~p13, +12q12~q23, +13q13~qter, +14q11.2~q31, +15q14~q26, +16q13~q24, +18p11.3, +18q, +20p11.2~p12, +21q
9	+2q31, +2q36~qter, +6q15~q16, +7p14~pter, +7q21~q22, +7q36, +8q11.2~q12, +10q24~q25, +11q22~q23, +13q34, +18q22~q23, -21q11.2
10	+2p23~pter, -9p13, -9q21, -15q11.2~q21, +16q24, +17q25, -21q11.2
11	+1p24.1~p34.2, +2p23, +2q24, +2q32, -2p11.2~q11.2, +3p21, +5q32~q33, +9q31~qter, +10q23, -14q11.2~q12, -16p13.1, +18q12~q21, -21q11.2~q21, -22q11.2
12	+1p13~p34.3, +1q23~q41, +2p16~p25, +2q24, +2q35~qter, +3p12~q25, +4p16, +4q12, +4q22~q27, +5q23~q34, +8p12, +8q24.1~qter, +13q14~qter, -14q11.2, +14q31~qter, +15q22~q23, -16p12~p13.1, +16q13~q21, +18q, -21q11.2~q21, +22q13
13	

14	+1p13~p31,+1p35,+2p16~p22,+6p12~p21.3,+7q31,+8p11.2~qter,+9q21,-14q11.2,- 15q11.2~q14,+16q24,-19q13.3~qter +1p34.2~34.3,+1q32,+2p16~p24,
15	+3p24~pter,+3q12~q22,+3p13~p15.1,+5q23~q32,+6p12~p21.3,+8q11.2~q12,+8q24.2,- 9p13~p21,+9q34,+11q12~q13,+12q12~q13,+12q24.3,+13q34,-14q11.2~q12,+14q24~qter,- 15q13~q15,+19p
16	+1p22~p34.2,+2p14~pter,+2q,+3p21,+3q12~q26.3,+5q14~q31,+6p12~q24,+7q22~qter, +8q24.2~qter,-8p13,-8q21,+8q34,+10q21~qter,+11p15~q13,+12q13~qter,+13q21~qter,- 14q11.2,+14q23~qter,-15q11.2~q12,+15q23~q24,-16p11.2~p12,+18q12~qter,-21q11.2~q21 +2p24~pter,+2q37,+3q12~q13.3,+5q31~qter,+8q24.2~qter,-
17	9q21,+9q34,+10q26,+11q12~q13,+11q22,+12q24.3,+13q31~qter,+14q32,- 15q11.2~q14,+18q23,+19q13.3,-21q21
18	+1p32~q44,+2p14~pter,+2q23~qter,+3,+4,+5,+6p21.2~q27,+7p22~q31,+8,+9p21~pter,+9q31~ q32,+10p15~q21,+11,+12,+13,+14,+15,+16q12.2~q23,+17q22~qter,+18,+20p11.2,+21q21
19	+1p22~p31,+3p21~q23,+4q12,+5q22~q32,+6p12~p22,+11q22~q23,+13q32,-16p12~p13.2,- 21q11.2
20	+1p32~p35,+1q24~q32,+2p16~pter,+2q22,+3p21,-4p16,+5p14,+5q11.2~q12,+6p12,- 15q14~q15,-21q11.2~q21
21	+1p25~p31,+2p24~pter,+2q12~q13,+4q31.1~q31.2,+5q31~q34,+6p11.2~p21.3,+8q21.3~q23,+1 0q22~qter,+13q31~q32
22	+1q25~q31,-9q21,+18q11.2~q21,-21q11.2~q21
23	+1p13,+2p23~p24,+2q33~qter,+5p14~q11.2,+6p12~p21.3,+8q21.3~qter,+11p15~q13,+12p12,+ 16q12.2~q13,+18p11.2~q23,-21q11.2~q21 +1p22~p31,+1q31,-
24	2p12,+2q33,+3q13.1,+4p15.1~p15.2,+5q15~q31,+6p11.2~p21.3,+7p14,+9q22~qter,+10q22~q2 3,+11p15~q13,+13q22~q32,-15q13~q14,-16p13.1
25	+7q31,-14q11.2~q12,-15q14~q15,-16p12p~13.1
26	+1p13~p33,+1q31,+2p21~pter,+2q22~q31,+5p14~q34,+6q14~q21,+7q31,+8p22,+8q22~q24.1, +11q22~q23,+13q21~qter,+15q21~q24,-16p12~pter,+16q,+18q,-21q11.2~q21
27	+1p24~q36,+4p14,+4q25~q34,+5,+8p11.2~q22,+10q22~q26,+11q14~q22,+12q12,+12q24.3,+1 4q21~q23,-16p12~p13.1,+17p13~q21,+18q11.2,+19q
28	+1q21~q22,-3p25,+4p14,+5p13~p14,+6p23~p24,-12p12~p13,-15q14~q15,+18q11.2
29	+1p12~p22,+1q31,+4q13,+6p11.2~p21.2,+10q25~qter,+11p14~pter,+11q23,+13q14~qter,+14q 24~q31,+15q22~qter,+16q12.1~q21,-21q11.2~q21

30	+1p31~p34.2,+2p24~pter,+3q12~q13.3,+3q26.1~q26.3,+4q13~q33,+5q21~qter,+7p14~p15,+7q31~qter,+8q23~qter,-9q21,+9q22~qter,+10q25~qter,+11p14,+12p13,+12q13~q21,+13q21~qter,-14q11.2~q12,-15q11.2~q12,-16p11.2,+18q21~qter,-21q11.2~q21
31	+1q24~q25,+3q12,+4q12~q13,+6p21.1~q12,+14q24,-15q15,+16q12.2~q21,+17p13~q12,+18p11.3~q11.2
32	+1p31~p35,+2p25,+2q35~qter,+3p14~p24,+4q24~q31.3,+5q14~q32,+6q21~q23,+7p15,+8q21.3~qter,-9q21,+10q24~qter,+11p13~pter,+11q14~qter,+12q24.2~qter,+13q14~qter,+14q21~qter,-15q11.2,-16p11.2~p12,+16q23~qter,+18q12~qter,-21q11.2,-22q11.2,+22q13
33	+6q16~q21
34	+1p31,+1q31~q32,+2p25,+3q24~q27,+5q23,+6q12~q22,+7q22~q31,+8q11.2~q13,+9p21~p23,+10q22,+11p12,+13q21
35	+1p13~p35,+1q31~q41,+2p22~pter,+2q22~qter,+3q12~q26.1,+4q26,+5q14~q21,+5q34~qter,+6p21.1~p21.3,+6q21~qter,+7p21,+7q36,+8q22~qter,-9p13~p21,-9q21,+10q22~qter,+11q14~qter,+12q13,+13q14~qter,-14q11.2,+14q24~qter,-16p12~p13.1,+18q12~qter,-21q11.2~q21
36	+1p31~p32,+1q24~q32,+3p21~p23,+5q14~q33,+6p11.2~p21.2,+6q26~qter,+8q24.1~qter,-9q21,+9q32~qter,+11p14,-14q11.2,+16q13~q21,-21q11.2
37	+2p23~pter,+3q23,-14q11.2~q12,+14q32,-16p11.2~p13.1,-21q11.2~q21
38	+2p21~p24,+2q32~q33,+3p21,+4q23~q26,+5q11.2,+6p12~q23,+8q13,+11p12~p13,+11q23~qter,+12q12~q14,-16p13.1~p13.3,+16q12.2~q13,+17p11.2~q11.2,+18p11.2~q12,+19p13.1~q13.1,-21q11.2~q21
39	+1,+2,+3,+4,+5,+6,+7,+8,+9p13~pter,+9q21~qter,+10p12~pter,+10q,+11,+12p13~q24.1,+13q,+14q,+15q14~qter,+16q12.2~qter,+17,+18,+19p13.2~q13.3,+20,+21q
40	+1q31~q32,+2p32,+3p21~q26.3,+4q13~q33,+5q34,+6p21.3~q16,+7p21,+8p12~p22,+9q31,+12q13~q22,+13q21,-14q11.2~q12,-16p11.2~p12,+16q12.2~qter,+18q12~qter,-21q11.2,-22q11.2
41	+2p23~pter,+3q23,-14q11.2~q12,+14q32,-16p11.2~p13.1,-21q11.2~q21

Tabela 12- Discriminação da alteração gênica das regiões cromossômicas específicas, por hibridização genômica comparativa – CGH (N=41), por paciente, relação entre o número de pacientes com alteração e o total por cromossomo (CR)

CR	PACIENTE													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	p32-p31	q21-q32	p34.2-p13 q21-q41	q31	p32-p33 q25-q31			p13-pter q23-q25	p+q			p24.1-p34.2 q23-q41	p13-p34.3 q23-q41	p13-p31 p35
2	q21	q32-q35	p24-pter q24	p23 q24	q24-q35		p23-pter	q37	p+q	q31 q36-qter	p23-pter	p23 q24 q32 -p11.2-q11.2	p16-p25 q24 q35-qter p12-q25	p16-p22
3		p21-q27	q12-q13.1	q23			q12-q13.1	q24	p+q			p21	p16 q12 q22-q27	
4		q12-q31.3	q23-q26	p14-q13					p13-p15.3 q					
5		-q35	p15.1-pter	q21-q34	p15.3				p13-pter q			q32-q33	q23-q34	
6	q16	p21.3-q21	p12-q12		p21.1	q14-q16 q23-q24			p12-p21.1 p22-p25 q	q15-q16				p12-p21.3
7			q11.2		p15-pter				p13-p13 q	p14-pter q21-q22 q36				q31
8		q23-qter	q24.1-qter	q13 q23	q24.1-qter		q24.2-qter		p+q	q11.2-q12			p12 q24.1-qter	p11.2-qter
9					q34		-q13-q21		p21-pter q21-q32 p12-pter		p13 -q21	q31-qter		q21
10		q24-qter					q24-qter		q	q34-q25		q23		
11		q13	q14-qter	q23-qter	q23-qter	p15		q24-qter	p12-pter q	q22-q23				
12	q12~13	q34	p11.2-p12 q14-q15				q24.3		p12-p13 q12-q23					
13		q22	q21-qter	q21-q32	q33-qter				q13-qter	q34			q14-qter	
14	-q11.2-q12				-q11.2-q13	-q11.2	-q11.2-q13		q11.2-q31			-q11.2-q12	-q11.2	-q11.2
15						-q11.2-q15			q14-q26			q31-qter	q31-qter	
16	-p12-p11.2	-p12-p11.2	-p13.1	-p12-p13.1 q12.2-q13	-p11.2-q13.1	-p11.2-p13.1	-p12		q13-q24		q24	p13.1	q22-q23 -p12-p13.1 q13-q21	-q11.2-q14 q24
17							q24-qter	-q33			q25			
18			p11.2-q22	q12-q22					p11.3 q	q22-q23		q12-q21	q	
19														-q13.3-qter
20									p11.2-p12 q					
21	-q11.2-q21	-q11.2	-q11.2-q21	-q11.2-q21	-p11.2-q21		-q11.2-q21			-q11.2	-q11.2	-q11.2-q21	-q11.2-q21	
22		q12-qter										-q11.2	q13	

Tabela 12- Discriminação da alteração gênica das regiões cromossômicas específicas, por hibridização genômica comparativa – CGH (N=41), por paciente, relação entre o número de pacientes com alteração e o total por cromossomo (CR)

CR	PACIENTE													
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	p34.2~p34.3 q32	p22~p34.2		p32~q44	p22~p31	p32~p35 q24~q32	p25~p31	q25~q31	p13	p22~p31 q31		p13~p33 q31	p24~q36	q21~q22
2	p16~p24	p14~pter q	p24~pter q37	p14~pter q23~qter		p16~pter q22	p24~pter q12~q13		p23~p24 q33~qter	p12 q33		p21~pter q22~q31		
3	p24~pter q12~q22 p13~p15.1	p21 q12~q26.3	q12~q13.3	p+q	p21~q23	p21				q13.1				p25
4				p+q	q12	p16 q11.2~q12	q31.1~q31.2			p15.1~p15.2			p14 q25~q34	p14
5	q23~q32	q14~q31	q31~qter	p+q	q22~q32	p14 q11.2~q12	q31~q34		p14~q11.2	q15~q31		p14~q34	p+q	p13~p14
6	p12~p21.3	p12~q24		p21.2~q27	p12~p22	p12	p11.2~p21.3		p12~p21.3	p11.2~p21.3		q14~q21		p23~p24
7	q11.2~q12	q22~qter q24.2~qter		p22~q31						p14	q31	q31		
8	q24.2	p13 q21 q34	q24.2~qter	p+q			q21.3~q23		q21.3~qter			p22 q22~q24.1	p11.2~q22	
9	p13~p21 q34		p21~ter q34 q36	p21~ter q31~q32 p15~q21				p21		q22~qter			q22~q26	
10		q21~qter	q26	p15~q21			q22~qter			q22~q23			q14~q22	
11	q12~q13	p15~q13	q12~q13 q22	p+q	q22~q23				p15~q13	p15~q13		q22~q23	q14~q22	
12	q12~q13 q24.3	q13~qter	q24.3	p+q					p12				q12 q24.3	p12 p15
13	q34	q21~qter	q31~qter	p+q	q32		q31~q32			q22~q32		q21~qter	q21~q23	
14	q11.2~q12 q24~qter	q11.2 q23~qter	q32	p+q							q11.2 q12			
15	q15 q15	q23~q24	q11.2 q14	p+q		q14 q15				q15 q14	q14 q15	q21~q24		q14 q15
16		p11.2 p12		q12.2~q23	q12 p13.2				q12.2~q13	q15.1	p12 p15.1	p12~pter q	p12 p15.1	
17				q22~qter									p13~q21	
18		q12~qter	q23	p+q				q11.2~q21	p11.2~q23			q	q11.2	q11.2
19	P		q13.3										q	
20				p11.2										
21		q11.2 q21	q21	q21	q11.2	q11.2 q21		q11.2 q21	q11.2 q21			q11.2 q21		
22														

Tabela 12- Discriminação da alteração gênica das regiões cromossômicas específicas, por hibridização genômica comparativa – CGH (N=41), por paciente, relação entre o número de pacientes com alteração e o total por cromossomo (CR)

CR	PACIENTE													Alterados/ Total
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
1	p12~p22 q31	p31~p34.2	q24~q25	p31~p35		p31 q31~q32	p13~p35 q31~q41	p31~p32 q24~q32			p+q	q31~q32		31/41
2		p24~pter		p25 q35~qter		p25	p22~pter q22~qter		P23~pter	p21~p24 q32~q33	p+q	p32	p23~pter	31/41
3		q12~q13.3 q26.1~q26.3 q13~q33	q12	p14~p24		q24~q27	q12~q26.1	p21~p23	q23	p21	p+q	p21~q26.3	q23	27/41
4	q13	q13~q33	q12~q13	q24~q31.3			q26 q14~q21	q23~q26		q23~q26	p+q	q13~q33		20/41
5		q21~qter		q14~q32		q23	q34~qter	q14~q33		q11.2	p+q	q34		27/41
6	p11.2~p21.2		p21.1~q12	q21~q23	q16~q21	q12~q22	p21.1~p21.3 q21~qter	p11.2~p21.2 q26~qter		p12~q23	p+q	p21.3~q16		28/41
7		p14~p15 q31~qter		p15		q22~q31	p21 q36				p+q	p21		16/41
8		q23~qter		q21.3~qter		q11.2~q13	q22~qter	q24.1~qter		q13	p+q	p12~p22		25/41
9		q21 q22~qter		q21		p21~p23	p13~p31 q21	q32~qter			p13~pter q21~qter p12~pter	q31		18/41
10	q25~qter	q25~qter		q24~qter		q22	q22~qter				q			17/41
11	p14~pter q23	p14		p13~pter q14~qter		p12	q14~qter	p14		p12~p13 q23~qter	p+q			25/41
12		p13 q13~q21		q24.2~qter			q13			q12~q14	p13~q24.1	q13~q22		18/41
13	q14~qter	q21~qter		q14~qter		q21	q14~qter				q	q21		22/41
14	q24~q31	q11.2~q12	q24	q21~qter			q11.2 q24~qter	q11.2	q11.2~q12 q32		q	q11.2~q12 q32		24/41
15	q22~qter	q11.2~q12	q15	q11.2			q11.2							19/41
16	q12.1~q21	q11.2	q12.2~q21	p11.2~p12 q23~qter			q12~p13.1	q13~q21		p13.1~p13.3 q12.2~q13	q14~qter			31/41
17										q12.2~q13 p11.2~q11.2	q12.2~qter	q12.2~qter	p11.2~p13.1	8/41
18										p11.2~q12	p+q	q12~qter		21/41
19		q21~qter	p11.3~q11.2	q12~qter			q12~qter			p13.1~q13.1	p13.2~q13.3			6/41
20											p+q			3/41
21	q11.2~q21	q11.2~q21		q11.2			q11.2~q21	q11.2	q11.2~q21	q11.2~q21	q	q11.2	q11.2~q21	29/41
22														5/41

Tabela 13- Distribuição de frequência absoluta (n) da alteração gênica de regiões cromossômicas (CR) específicas, por hibridização genômica comparativa – CGH (N=41). Comparação pelo teste de qui-quadrado de uma amostra ($\alpha=0,05$)

CR	ALTERAÇÃO					REGIÃO ALTERADA					QUI-QUADRADO				
	Ausente	Presente	(+)	(-)	(+/-)	Σ (+)	Σ (-)	(p)	(q)	(p/q)	Σ (p)	Σ (q)	Ausc↔Pres	Σ (+)↔Σ (-) (q)	Σ (p) ↔Σ (q)
1	10	31	31	0	0	31	0	10	6	15	25	21	0,01*	-0,00*	0,56
2	10	31	29	0	2	31	2	10	5	16	26	21	0,01*	-0,00*	0,47
3	14	27	07	0	0	27	0	6	12	9	15	21	0,04*	-0,00*	0,32
4	21	20	19	1	0	19	1	3	11	6	9	17	0,86	0,00006*	0,12
5	14	27	26	1	0	26	1	3	18	7	10	25	0,04*	0,000002*	0,01*
6	13	28	28	0	0	28	0	10	7	11	21	18	0,02*	-0,00*	0,63
7	25	16	16	0	0	16	0	4	6	6	10	12	0,16	0,00006*	0,67
8	16	25	24	0	1	25	1	1	16	8	9	24	0,16	0,000003*	0,01*
9	23	18	9	5	4	13	9	1	11	6	7	17	0,43	0,39	0,04*
10	24	17	17	0	0	17	0	0	14	3	3	17	0,27	0,00004*	0,002*
11	16	25	25	0	0	25	0	4	12	9	13	21	0,16	0,000001*	0,17
12	23	18	17	1	0	17	1	2	11	5	7	16	0,43	0,0002*	0,06
13	19	22	22	0	0	22	0	0	21	1	1	22	0,64	0,000003*	0,00001*
14	17	24	8	10	6	14	16	0	23	1	1	24	0,27	0,72	0,000004*
15	22	19	6	12	1	7	13	0	18	1	1	19	0,64	0,18	0,00006*
16	10	31	10	16	5	15	21	15	9	7	22	16	0,01*	0,32	0,33
17	33	8	7	1	0	7	1	0	4	4	4	8	0,0001*	0,03*	0,25
18	20	21	21	0	0	21	0	0	14	7	7	21	0,86	0,000005*	0,008*
19	35	6	5	1	0	5	1	1	3	2	3	5	0,000006*	0,10	0,48
20	38	3	3	0	0	3	0	2	0	1	3	1	-0,00*	0,08	0,32
21	12	29	3	26	0	3	26	0	29	0	0	29	0,008*	0,00006*	-0,00*
22	36	5	2	2	1	3	3	0	5	0	0	5	0,0000001*	1,00	0,03*

<i>AUSENTE</i>	Pacientes sem alteração gênica
Presente	Pacientes com alteração gênica
(+)	Pacientes com amplificação gênica
(-)	Pacientes com deleção gênica
(+/-)	Pacientes com amplificação e deleção gênica com diferentes regiões específicas do mesmo cromossomo
Σ (+)	Total de pacientes com amplificação gênica
Σ (-)	Total de pacientes com deleção gênica
(p)	Pacientes com alteração na região cromossômica p
(q)	Pacientes com alteração na região cromossômica q
(p/q)	Pacientes com alteração nas regiões cromossômicas p e q
Σ (p)	Total de pacientes com alteração na região cromossômica p
Σ (q)	Total de pacientes com alteração na região cromossômica q

Tabela 14- Estado atual dos pacientes com osteossarcoma incluídos no estudo

STATUS		CASO N°																																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41				
RCC		X		X			X	X	X	X	X							X							X										X							X				
OD														X	X				X				X																							
OI					X								X				X									X																				
OT			X																	X																										
VD						X																																								
VT												X					X			X	X			X																						

RCC = VIVO, EM REMISSÃO CLÍNICA COMPLETA
OD = ÓBITO POR PROGRESSÃO DE DOENÇA
OI = ÓBITO POR INFECÇÃO (SEPS)

OT = ÓBITO POR NEFROTOXICIDADE
VD = VIVO COM DOENÇA EM ATIVIDADE (REFRATÁRIO A TERAPIA)
VT = VIVO EM TERAPIA, SEM ATIVIDADE DE DOENÇA

Tabela 15- Distribuição da frequência absoluta (n) da alteração gênica das regiões específicas do cromossomo 5 por hibridização genômica comparativa – CGH. Comparação pelo teste de qui-quadrado de uma amostra ($\alpha=0,05$)

REGIÃO	ALTERAÇÃO CROMOSSOMO 5			χ^2
	Amplificação	Deleção	Normal	
p	10	0	31	0,001*
q	23	1	18	0,27

Tabela 16- Distribuição da frequência absoluta (n) da alteração gênica das regiões específicas do cromossomo 21 por hibridização genômica comparativa – CGH. Comparação pelo teste de qui-quadrado de uma amostra ($\alpha=0,05$)

REGIÃO	ALTERAÇÃO CROMOSSOMO 21			χ^2
	Amplificação	Deleção	Não Deleção	
q	3	26	15	0,008*
q11.2	2	25	16	0,04*
q21	3	19	22	0,64
q11.2~ q21	2	18	23	0,88

Uma vez detectada a frequência em ocorrer alterações nos cromossomos 5 e 21, foi aplicado o teste qui-quadrado. Dentre as anormalidades encontradas no cromossomo 5 , obteve-se principalmente amplificação no braço curto (5p), $p=0,001$. No cromossomo 21 houve maior frequência de deleção no braço longo ,-21q ($p=0,008$) *locus* q11.22 ($p=0,04$), Tabelas 15 e 16.

A presença da deleção nos genes *P53* e *RB1* foi estudada pela técnica de *FISH* e analisada pelo teste qui-quadrado, sendo positiva em 68,3% dos casos para o gene *P53* ($p=0,02$) e em 87,8% dos casos para o gene *RB1* ($p=0,000001$) ,Tabelas 17 e 18.

Não houve correlação estatisticamente significativa entre a deleção do gene *P53* ($p=0,54$) e/ou do gene *RB1* ($p \cong 1,00$) comparada à deleção encontrada no cromossomo 21 (Tabelas 19 e 20).

Tabela 17- Achados de deleção dos genes *P53* E *RB1* do tecido tumoral, dos pacientes com osteossarcoma, pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

PACIENTES	GENE	
	<i>P53</i>	<i>RB1</i>
1	Negativo	Positivo
2	Negativo	Negativo
3	Positivo	Positivo
4	Negativo	Positivo
5	Positivo	Positivo
6	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo
8	Negativo	Positivo
9	Positivo	Positivo
10	Positivo	Positivo
11	Positivo	Positivo
12	Negativo	Positivo
13	Negativo	Negativo
14	Positivo	Positivo
15	Positivo	Positivo
16	Positivo	Positivo
17	Positivo	Positivo
18	Positivo	Positivo
19	Positivo	Positivo
20	Negativo	Negativo
21	Positivo	Positivo
22	Positivo	Positivo
23	Positivo	Positivo
24	Positivo	Positivo
25	Negativo	Positivo
26	Positivo	Positivo
27	Positivo	Positivo
28	Positivo	Positivo
29	Positivo	Positivo
30	Positivo	Positivo
31	Negativo	Negativo
32	Positivo	Positivo
33	Negativo	Positivo
34	Negativo	Positivo
35	Positivo	Positivo
36	Positivo	Positivo
37	Negativo	Positivo
38	Positivo	Positivo
39	Positivo	Positivo
40	Positivo	Positivo
41	Negativo	Negativo

Tabela 18- Distribuição da frequência, absoluta (n) e relativa (%), da deleção dos genes *P53* E *RBI* do tecido tumoral, dos pacientes com osteossarcoma, pela técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH). comparação pelo teste qui-quadrado de uma amostra ($\alpha=0,05$)

	GENE			
	<i>P53</i>		<i>RBI</i>	
	N	%	n	%
Normal	13	31,7	5	12,2
Deleção	28	68,3	36	87,8
TOTAL	41	100,0	41	100,0
Qui-quadrado	0,02*		0,000001*	

Tabela 19- Distribuição da frequência da deleção do gene *P53* do tecido tumoral dos pacientes com osteossarcoma, segundo a presença de alteração do cromossomo 21, pela hibridização genômica comparativa – CGH. Comparação pelo teste exato de FISHER

DELEÇÃO <i>P53</i>	CROMOSSOMO 21		
	Amplificação	Deleção	TOTAL
Ausente	0	8	8
Presente	3	18	21
TOTAL	3	26	29 ¹

¹ cromossomo 21, não alterado em 12 pacientes

Fisher p = 0,54

Tabela 20- Distribuição da frequência da deleção do gene *P53* do tecido tumoral dos pacientes com osteossarcoma, segundo a presença de alteração do cromossomo 21, pela hibridização genômica comparativa – CGH. Comparação pelo teste exato de FISHER

DELEÇÃO <i>RBI</i>	CROMOSSOMO 21		
	Amplificação	Deleção	TOTAL
Ausente	0	4	4
Presente	3	22	25
TOTAL	3	26	29 ¹

¹ cromossomo 21, não alterado em 12 pacientes

Fisher $p \cong 1,00$

5- DISCUSSÃO

O osteossarcoma é o tumor ósseo mais freqüente da infância e adolescência. No início da década de 1960, mais de 80% dessas crianças, que ao diagnóstico apresentavam-se sem metástases, recaíam da doença e morriam até 5 anos após o diagnóstico, apesar das cirurgias agressivas a que eram submetidas (geralmente amputações). Nas últimas 3 décadas, progressos no entendimento da biologia e etiologia do OS, melhoria nos diagnósticos por imagem, tanto do tumor primário quanto de suas metástases e, os avanços terapêuticos (quimioterápicos e cirúrgicos) propiciaram grande impacto na sobrevida destas crianças, com qualidade de vida ao preservar o membro afetado pelo tumor, com a realização de cirurgias conservadoras e com colocação de endopróteses. Nos últimos 15 anos, conhecimentos de citogenética e biologia molecular direcionaram para novos caminhos na pesquisa da patogênese deste tumor, cuja etiologia ainda é desconhecida (LINK, 2006).

Na casuística do presente estudo, houve uma relação de freqüência quanto ao sexo, de 1,4:1 (feminino:masculino), proporção esta invertida em relação à literatura, que é de 2:1 (masculino:feminino) BACCI, 2000 ; PIZZO, 2002. Não há explicação para este achado epidemiológico, principalmente se considerarmos que todos os casos incluídos desta patologia foram consecutivos, ingressados no Centro Infantil Dr. Domingos Boldrini no período de 1999 até 2005. Esta proporção se mantém, mesmo com o acréscimo daqueles casos excluídos (n= 11), por não termos conseguido extrair DNA do material do tumor. Esta talvez seja uma particularidade de nossa população.

Observamos também, o predomínio da raça branca em 80,5% dos casos. Como a prevalência de negros na região sudeste do Brasil é de 20%, segundo dados do último censo do IBGE de 2000, os achados nesta população do estudo, já eram esperados. Apenas 2 pacientes eram negros e, 6 pardos, totalizando 19,5% dos casos. Nos EUA, como há maior porcentagem da raça negra compondo a população americana, este tipo de tumor é mais freqüente nos negros (LINK,2006). Resultados preliminares do Grupo Cooperativo Brasileiro para tratamento de osteossarcoma, OS-2000, em análise de 123 pacientes, detectaram que 52% dos pacientes eram do sexo feminino, 63% da raça branca (PETRILLI, 2003).

BACCI, 2003 e 2000 publicou resultados do Grupo Cooperativo Italiano para tratamento de osteossarcoma referindo em estudo com 57 pacientes portadores de OS com idade entre 6 a 39 anos (mediana de 18,1 anos), que 67% dos pacientes eram do sexo masculino e 33% do sexo feminino (2:1). A faixa etária dos pacientes do presente estudo é semelhante aquela encontrada na literatura pediátrica, variando de 6 anos e 6 meses a 22 anos (mediana de 12 anos e 4 meses). A maioria dos casos se encontrava entre 6 e 14 anos de idade (78%). A prevalência dos OS nesta faixa etária mais precoce, provavelmente se deve às características do nosso Hospital, que estabelece a idade de 23 anos como limite para admissão dos pacientes. Os grandes centros que tratam tumores ósseos, tanto norte americanos quanto europeus, trabalham com idades mais avançadas, até 30 ou 40 anos ao diagnóstico (**BACCI, 2003; KAGER, 2003; COTTERILL, 2004; LINK, 2006**). **PETRILLI, 2003** em estudo nacional relatou que a idade média ao diagnóstico foi de 14 anos. Convém esclarecer que este protocolo teve como critério de inclusão pacientes da faixa etária até 30 anos.

KAGER, 2003, em publicação pelo Grupo Cooperativo Alemão-Austriaco-Suíço (*COSS*) com 1765 pacientes analisados, todos com histologia de alto grau de malignidade, apresentaram idade média de 15 anos ao diagnóstico (variando de 2 a 66 anos), havendo discreto predomínio do sexo masculino com relação ao feminino (1,12:1).

Os sítios primários mais freqüentemente acometidos pelo OS no presente estudo foram: fêmur em 44% (18/41 casos), tíbia em 26,8% dos casos (11/41), úmero em 9/41 casos (22%) e um caso de acometimento nos ossos rádio, pélvis e calcâneo (7,2%). Já no grupo Italiano, 57% dos casos eram originários do fêmur, 17% da tíbia e úmero e os 9% restantes, distribuídos entre rádio, fíbula e calcâneo (**BACCI, 2003; FERRARI, 2001**). E, no *COSS*, os ossos das extremidades foram os mais freqüentemente acometidos, em relação ao esqueleto axial (5:1), **KAGER, 2003**.

Na presente casuística, o subtipo histológico predominante foi o osteoblástico em 35 casos (85,4%), seguido do condroblástico em 5/41 casos (12,2%) e apenas 1 caso de OS teleangiectásico (2,4%). A histologia de alto grau de malignidade, com predomínio do subtipo osteoblástico já era esperado, por ser este o subtipo mais freqüente na pediatria.

BACCI et al., 2003, pelo grupo Italiano, registraram entre os pacientes com OS, prevalência histológica do subtipo osteoblástico, presente em 59% dos casos, seguido do subtipo condroblástico em 15% dos casos e do subtipo fibroblástico em 12% dos casos. Por tratar-se de estudo cooperativo, não foi possível confirmar o subtipo histológico em 14% dos pacientes. Os dados americanos revelaram grande variedade histológica para este tipo de tumor, com diferentes graus de formação de matriz osteóide, sendo em alguns casos necessária a realização de microscopia eletrônica para melhor diferenciar a histologia destes tumores. Mas, a maior prevalência também foi do subtipo osteoblástico (**LINK, 2006**).

Na literatura, a metástase pulmonar nos doentes com OS, ocorre em cerca de 20% dos casos. Tem melhor prognóstico quando apresentam-se únicas e/ou quando totalmente ressecadas e com bom grau de necrose após uso de quimioterapia. A sobrevida em 3 anos para estes pacientes com metástase pulmonar varia entre 10 a 40% (**TSUCHIYA, 2002; KAGER, 2003; BACCI, 2003**). No presente estudo, dezoito pacientes (43,6%) apresentavam-se com metástases pulmonares múltiplas ao diagnóstico. Provavelmente isto decorreu do atraso diagnóstico, com demora do encaminhamento para tratamento em centro especializado, infelizmente ainda freqüente no país. Apesar disso, a Sobrevida Global (SG) em 7 anos de acompanhamento desses pacientes metastáticos foi de $42\% \pm 1,3\%$ e, a Sobrevida Livre de Eventos (SLE) foi de $25\% \pm 1,2\%$. Vinte e três pacientes (56,4% dos casos) não eram metastáticos ao diagnóstico e, em 7 anos de seguimento apresentaram SLE de $65\% \pm 1,2\%$, sendo este resultado comparável aos da literatura (**CRAFT, 2004; MARINA, 2004**). Nas figuras 24 e 25 (páginas 89 e 90) estão contidos os resultados referentes à sobrevida dessas crianças.

No momento da admissão de cada um dos 41 pacientes no Serviço, foram realizados exames séricos de função renal e hepática, de imagem e biópsia por agulha em região do tumor, para diagnóstico histopatológico e envio de parte deste material para o laboratório de citogenética, para extração de DNA e posterior criopreservação das amostras a -70°C em banco de tumor.

Trinta e três dos 41 pacientes deste estudo foram submetidos ao mesmo protocolo quimioterápico (POG/CCG P9754), com Cisplatina: 600mg/m² dose cumulativa; Methotrexate 12g/m² /ciclo por 10 ciclos , Doxorrubicina com 375mg/m² dose cumulativa , Ifosfamida 36g/m² dose cumulativa e Etoposide 2,4g/m² no total. Os outros 8 pacientes foram tratados com o protocolo piloto Brasileiro, com Doxorrubicina 400mg/m² dose cumulativa , Ifosfamida 45g/m² dose cumulativa, Etoposide 1,9g/m² dose cumulativa e Cisplatina 480mg/m² no total. A cirurgia do tumor primário foi realizada entre as semanas 11 e 12 do tratamento , sendo que em 80,6% dos casos a cirurgia foi conservadora, com colocação de endopróteses e/ou enxertias ($p=0,0002$). Em 7 doentes (19,4%) a cirurgia realizada foi de amputação do membro afetado pelo tumor, indicada em decorrência de fratura patológica ao diagnóstico, ou grande volume do tumor com circulação colateral e pouca resposta quimioterápica, ou biópsia excisional seguida de curetagem, realizada em outro serviço. Cinco pacientes não realizaram cirurgia . Dois destes (casos 2 e 21) foram a óbito por nefrotoxicidade e excreção retardada do Methotrexate, antes da programada semana cirúrgica. O caso 25 não foi operado por ter falecido em decorrência de sepse durante episódio de febre e neutropenia severa, pós quimioterapia, antes das semanas 11 e 12 da terapia. Dois casos (nº 27 e 30), apresentavam-se ao diagnóstico, com múltiplas metástases pulmonares, falecendo por progressão do tumor, antes do momento cirúrgico.

Os 36 pacientes submetidos à cirurgia, tiveram análise histológica da peça obedecendo os critérios de **HUVOS, 1977**. Estes critérios quantificam a resposta histológica após o uso de quimioterapia, correlacionando a presença de células malignas residuais com pior prognóstico evolutivo. Classifica como Grau IV quando não há evidência de tumor viável na peça cirúrgica, com 100% de necrose; de Grau III quando há boa resposta à quimioterapia, com necrose maior que 90% na peça cirúrgica e presença de focos de tumor viável; de Grau II, chamado de resposta parcial à quimioterapia, ainda com áreas de tumor viável e necrose entre 50% e 90% e, de Grau I quando na peça cirúrgica examinada não houve resposta ou efeito quimioterápico e a necrose foi menor que 50%. No presente estudo, em 50% dos casos (18/36) houve predomínio do grau III de necrose ($p=0,002$). Com protocolos modernos, os grau III e IV de necrose são esperados (**CRAFT, 2004; MARINA 2004**). Este grupo de pacientes com grau III de necrose apresentou SG em 7 anos de 76% $\pm$ 1,2%. Dez casos tiveram grau II de necrose, com SG

em 7 anos de seguimento de $54\% \pm 2\%$. Cinco casos com grau IV de necrose apresentaram SG em 7 anos de $80\% \pm 1,7\%$. Apenas 3 casos tiveram grau I de necrose, que apesar da pouca resposta à terapêutica empregada, mantém SG em 7 anos de seguimento de $67\% \pm 2,7\%$. Na figura 28 (página 93) se visualizam as diferentes curvas de sobrevida, de acordo com o grau de necrose histopatológica da peça cirúrgica após a quimioterapia.

Três dos 41 pacientes recidivaram (casos 15, 29 e 32). O caso 15, não metastático ao diagnóstico , apresentou recidiva pulmonar e para parênquima cerebral 2 meses após o término da terapia , falecendo por progressão do tumor 4 meses após o reinício do tratamento quimioterápico. O caso 29, metastático para pulmão ao diagnóstico, realizou cirurgia conservadora no membro com o tumor primário, com colocação de endoprótese, apresentando recidiva em sítio cirúrgico e em pulmão, 1 ano e 10 meses após o término da terapia. Reiniciou quimioterapia, realizou nova cirurgia em local do tumor primário e pulmão, radioterapia, estando vivo em 2ª remissão completa, há 4 anos. O caso 32, com doença metastática para pulmão ao diagnóstico, apresentou recidiva pulmonar após 1 ano e 7 meses do término da terapia. A paciente está viva com doença em atividade, refratária à quimioterapia.

Dezoito pacientes apresentavam metástase pulmonar ao diagnóstico. Três deles (casos 2, 27 e 30) morreram antes do momento cirúrgico. Os demais doentes que apresentavam metástase pulmonar ao diagnóstico ($n=15$) foram submetidos à toracotomia para ressecção das mesmas, na 20ª semana quimioterápica. Conforme mencionado, SLE para este grupo de pacientes com metástases pulmonares, em 7 anos de acompanhamento foi de $25\% \pm 1,2\%$ ($p=0,08$).

Vinte e oito dos 41 pacientes estão vivos ($p= 0,04$), sendo 17 fora de terapia e em remissão clínica completa. Nove pacientes ainda estão em terapia, livres de doença. Dois pacientes estão vivos, mas com doença em atividade. Na tabela 10 (página 88), especificamos estes achados. No gráfico representado pela figura 27 (página 92), a SLE de acordo com a presença de metástases pulmonares ao diagnóstico, observam-se curvas equiparáveis àquelas dos grandes centros internacionais, com pior prognóstico aos pacientes metastáticos ($p=0,08$). A SLE em 7 anos para todos os pacientes do estudo foi de

46,8% e a SG foi de 61,5%. Quando analisamos os casos excluindo os metastáticos, a sobrevida global foi de $75\% \pm 0,9\%$ em 7 anos, semelhante à encontrada na literatura (MARINA, 2004; CRAFT, 2004; BACCI, 2003; KAGER, 2003). Entretanto, quando se analisam todos os pacientes em relação à SG (figura 26, página 91) a diferença não foi significativa ($p=0,15$), apesar da tendência a piores resultados no grupo metastático.

Treze pacientes faleceram. Seis por sepse decorrente a infecção e neutropenia severa pós quimioterapia, 5 por progressão da doença (dentre eles está o caso 22, falecida por segunda neoplasia) e 2 morreram em decorrência de nefrotoxicidade à quimioterapia. Para todo o grupo, a ocorrência de toxicidade graus 3 e 4 foi de 19,5%, sendo 4,9% para nefrotoxicidade (Tabela 10, página 88).

É descrito na literatura em crianças que trataram de OS a ocorrência de segunda neoplasia, principalmente leucemias. Esta, pode estar relacionada à Síndrome de Li-Fraumeni ou ser secundária à quimioterapia empregada para o tratamento do osteossarcoma, principalmente aos agentes alquilantes (Cisplatina, Ifosfamida) e ao Etoposide (MARINA, 2004; LINK, 2006).

Em nossa casuística, duas pacientes tiveram leucemia mielóide aguda como segunda neoplasia (casos 22 e 36), no período de 11 meses e de 2 anos após o término da terapia do osteossarcoma, totalizando 4,8% dos casos. Ambas tinham ao diagnóstico do OS a deleção dos genes *RBI* e *P53* no tecido do tumor, e expressão negativa na medula óssea (ou seja, tanto o *RBI* quanto o *P53* eram normais), por ocasião do diagnóstico da segunda neoplasia, sugerindo a interferência dos agentes quimioterápicos como causadores do segundo tumor.

BACCI et al., 2000, relataram que 5 (3%) entre 164 pacientes com até 40 anos de idade, tratados por osteossarcoma com o protocolo Italiano, tiveram leucemia mielóide aguda como segunda neoplasia, num intervalo de 1 a 12 anos (média de 6 anos), após término da primeira terapia. Nenhum deles relatava outros casos de osteossarcoma na família, ou casos de retinoblastoma ou Síndrome de Li-Fraumeni. Neste estudo, a segunda neoplasia foi, em todos os 5 casos, atribuída ao uso de agentes alquilantes na primeira terapia.

Desde 1973, tem-se descrito casos de famílias com vários membros acometidos pelo mesmo tipo de tumor (OS), sugerindo a predisposição genética para a ocorrência deste câncer (SWANEY, 1973; COLYER, 1979; HUVOS, 1991). A predisposição genética dos pacientes portadores de retinoblastoma hereditário e com deleção do gene *RBI* em células germinativas, de desenvolverem uma segunda neoplasia é estimada de ocorrer entre 8 a 90% em 30 anos de seguimento, sendo que em cerca de 50% dos casos, o tumor mais freqüentemente encontrado é o OS. Apesar da ocorrência da neoplasia secundária nos sobreviventes de retinoblastoma, ter sido atribuída ao efeito secundário à radioterapia (SAGERMAN, 1969), hoje é conhecida a existência da relação entre OS e retinoblastoma hereditário, independentemente da terapia empregada. Isso decorre da presença da deleção germinativa dos genes envolvidos nestas duas doenças. O OS é 2.000 vezes mais freqüente em ossos irradiados na terapia do retinoblastoma e, 500 vezes mais freqüente em extremidades não irradiadas, comparado com a população geral. Vários estudos confirmaram que o envolvimento genético presente no cromossomo 13q14, com deleções ou rearranjos no gene *RBI* predispõe o aparecimento do retinoblastoma e do osteossarcoma (FRIEND, 1986; ALONSO, 2001; CHAUVEINC, 2001).

Outro gene envolvido na patogênese do OS é o *P53*, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p). A ocorrência da perda de heterozigose principalmente 17p12~13.3, está associada ao aparecimento do OS. Dois genes supressores de tumor, o *RBI* e o *P53* estão envolvidos no ciclo celular. Se há perda dos dois alelos, alterações nestes dois genes supressores, que modificam proteínas envolvidas no ciclo celular, são freqüentemente encontrados em tumores malignos. Análises de DNA do OS e de tecido normal de pacientes portadores de OS, demonstraram perda nos cromossomos 3q e 18q e ganho nos cromossomos 13q e 17p (*locus* do *RBI* e do *P53*, respectivamente), sugerindo que pelo menos dois genes de supressão tumoral estejam envolvidos no desenvolvimento do osteossarcoma (YAMAGUCHI, 1992).

Em nossa casuística, 36/41 casos (87,8%) apresentaram a deleção gene *RBI* pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente ($p=0.000001$). Apenas em 5 casos este achado não foi documentado (casos 2, 13, 20, 31 e 41).

O achado de deleção do gene *P53*, analisada pela técnica de *FISH* no tecido do tumor ao diagnóstico do OS, foi de 31,7% (13/41 casos). A deleção do gene *P53* foi encontrada em 68,3% dos casos ($p=0,02$). Nos 5 casos onde a deleção do gene *RBI* foi negativa, o gene *P53* também o foi (casos 2, 13, 20, 31 e 41). No presente estudo, a ausência de deleções dos genes *P53* e *RBI* não teve impacto prognóstico. O caso 2 foi a óbito por toxicidade à quimioterapia; os casos 13 e 31 faleceram por sepse decorrente de toxicidade hematológica; o caso 20 está vivo, em terapia e o caso 41 está vivo, em remissão clínica completa há 5 anos.

A resposta histológica do tumor, em relação à quimioterapia pré operatória empregada continua sendo importante marcador biológico de prognóstico em OS. Ainda hoje, a sensibilidade à quimioterapia não pode ser reconhecida ao diagnóstico, no sentido de definir qual a melhor estratégia terapêutica, com objetivo de aumentar a sobrevida destas crianças. Para os pacientes bons respondedores a chance de cura é de 70% em 5 anos. Estudos citogenéticos têm demonstrado que são complexas as alterações cromossômicas presentes nos OS. Apesar da perda de heterozigose nos cromossomos 13q e 17p envolvidos na patogênese dos OS, levarem a inativação dos genes *RBI* e *P53* respectivamente, a relação entre o envolvimento destas alterações gênicas com o prognóstico evolutivo destes tumores, ainda não está bem definida (YAMAGUCHI, 1992; TARKKANEN, 1999; STOCK, 2000; OSAKI, 2003; MARINA, 2004).

As deleções observadas por BRIDGE, 1997, principalmente nos cromossomos 9, 10, 13 e 17 são as mais freqüentemente encontradas nos OS, comparativamente às amplificações, especialmente no cromossomo 1. Estas freqüentes deleções, principalmente no cromossomo 17, inativam o *P53*, gene aparentemente diretamente envolvido na patogênese do OS. A perda ou mutação de outro gene supressor de tumor, o *RBI* também está envolvida na gênese do OS. Esta perda de heterozigose e alterações no gene *RBI*, parecem estar implicadas com pior prognóstico para os doentes com OS. Em nossa casuística, as deleções nos cromossomos 9, 13 e 17 não foram achados significativamente encontrados. O cromossomo 1 apresentou amplificações em 31/41 casos, sendo que em 10 casos o comprometimento ocorreu no braço curto (1p), e em 15 casos em ambos. Estas alterações são também encontradas literatura (BRIDGE, 1997). As deleções nos

cromossomos 9, 13 e 17 não se confirmaram na nossa casuística, detalhada na tabela 13 (páginas 101 e 102).

Outros estudos de *CGH* em osteossarcoma têm sido publicados (**FORUS, 1995; TARKKANEN, 1995; 1998; 1999; SZYMANSKA, 1996; BRINKSCHMIDT, 1998; MERTENS, 2000**) identificando freqüentes regiões de ganhos nos cromossomos 1q, 4q, 5p, 7q, 8q, 14q e no cromossomo 19, além de perdas nos cromossomos 2q, 3p, 6q, 7p e 10p. Sítios, com altos índices de ganhos ou de ampliações, têm sido identificados nos cromossomos 8q23~24, 12q12~q13 e 17p11~p12. Com a melhoria dos estudos de citogenética e biologia molecular nos osteossarcomas, anormalidades recorrentes e instabilidade cromossômica, têm sido detectadas com maior precisão (**BAYANI,2003**).

OSAKI et al., 2002 estudaram 47 tumores de OS, sendo 41 de tecidos ao diagnóstico e 6 no momento da recidiva, tratados pelo protocolo *COSS*. Alterações gênicas ao diagnóstico foram encontradas em 40 dos 41 tumores examinados e nos 6 tumores recidivados. Os ganhos foram mais freqüentes que as perdas (1,3:1). Os ganhos mais freqüentes, naquele estudo, foram nos cromossomos 8q, 1p21~31, 1q21~24, 17p13 e 19p ($p=0,001$) e as perdas no cromossomo 9p ($p=0,027$). As duas últimas alterações (19p e 9p) foram mais freqüentemente detectadas nos pacientes pobre respondedores à quimioterapia, sugerindo que suas presenças possam vir a ser fator de pior prognóstico. O mesmo grupo em 2003, analisando 8 casos de osteossarcoma de alto grau pela técnica de *CGH*, encontrou ganhos nos cromossomos 1p21~31, 7q22~q31 e 8q23~24 e perdas nos cromossomos 3p12~p13, 18q12~q23, 10p e 19p. Esta nova alteração cromossômica (19p) talvez esteja envolvida em um dos mecanismos da ativação da oncogênese nos tumores malignos (**OSAKI,2003**). No presente estudo, apenas 5 casos apresentaram amplificação no cromossomo 19. O caso 15, com amplificação no braço curto do cromossomo 19 (19p) faleceu por progressão do tumor, refratário à quimioterapia. Dois pacientes (casos 17, 27) apresentaram amplificação no braço longo do cromossomo 19 (19q). Ambos foram a óbito. O primeiro por sepse durante episódio de neutropenia febril e, o segundo por progressão da doença refratária à terapêutica empregada. Outros 2 casos apresentaram amplificação em ambos os braços do cromossomo 19 (casos 38 e 39). O primeiro paciente está vivo e em

terapia, tendo realizado cirurgia do tumor, com grau I de necrose na peça cirúrgica. O caso de nº 39 foi a óbito por sepse, durante a terapia. O baixo número de casos com esta amplificação no cromossomo 19 não nos permitiu correlacionar sua expressão com o prognóstico evolutivo dessas crianças.

Com toda essa complexa alteração cromossômica presente nos osteossarcomas, algumas regiões parecem estar mais afetadas que outras (ex. amplificações nos cromossomos 6p, 12q13q~q15, 17p11.2~p12 e 19q12~q13), algumas delas podendo estar correlacionadas com o subtipo histológico destes tumores, principalmente nos de alto grau de malignidade, mais freqüentemente na faixa etária pediátrica (**SANDBERG, 2003**). Pacientes com aumento de número de cópias no cromossomo 8q13 e/ou 8q21.3~q22 parecem ter pior prognóstico e menor sobrevida (**TARKKANEN, 1999; SQUIRE, 2003**). Em 2002, **BATANIAN** estudando em tecido de 4 casos de osteossarcoma pediátrico, detectou alterações cromossômicas pela técnica de *CGH*, observando ganhos nos cromossomos 1p, 4q, 17p e 21q (2 casos) e perdas nos cromossomos 3q e 16p.

Amplificações nos cromossomos 6p, 12q13q~q15, 17p11.2~p12 (presentes em 13 a 32% dos casos da literatura) e no cromossomo 19q12~q13, são encontradas principalmente nos OS de subtipo histológico de alto grau de malignidade. Os pacientes com amplificação no cromossomo 8q13 e/ou 8q21.3~q22 parecem ter pior prognóstico, tendendo a uma sobrevida global mais curta (**TARKKANEN, 1999; SQUIRE, 2003; SANDBERG, 2003; van DARTEL, 2004**). Apesar de todos os 41 casos deste estudo apresentarem histologia de alto grau de malignidade, apenas 5/41 casos apresentaram amplificação no cromossomo 19 (1 no braço curto, 3 no longo e 2 casos em ambos), não sendo possível correlacionar esta expressão com a histologia destes tumores. Vinte e quatro pacientes apresentaram amplificação no cromossomo 8, sendo que em 16/24, ocorreu no braço longo do cromossomo 8 (8q). É interessante verificar que embora pior prognóstico esteja associado à amplificação no 8q, apenas dois de nossos pacientes (casos 15 e 30) faleceram por progressão da doença. Os casos 5 e 32 estão vivos mas, com doença refratária à quimioterapia. Os casos 3, 7, 10 e 35 e estão vivos e em remissão clínica completa. Os casos 23, 34, 36 e 38 estão vivos, em terapia, sem evidência de doença ativa após a cirurgia. Os casos 2 e 21 faleceram por toxicidade à quimioterapia (nefrotoxicidade

secundária ao Methotrexate) e, os casos 4 e 17 foram a óbito por sepse durante episódio de neutropenia febril. Embora 63% dos pacientes com amplificação do 8q estejam vivos, não pudemos nesta análise, caracterizar a amplificação no cromossomo 8q como fator determinante de prognóstico em nossa população de estudo.

STOCK, 2000 estudou 16 casos de osteossarcoma de alto grau, com idade entre 8 e 26 anos ao diagnóstico (mediana de 15 anos), observando que os ganhos cromossômicos eram mais freqüentes que as perdas. Os cromossomos envolvidos nestas amplificações foram 8q (11 casos), 4q (9 casos), 7q (8 casos), 5p (7 casos) e 1p (8 casos), nos *locus* 8q23 (10 casos), 4q12~13 (8 casos), 5p13~14 (7 casos), 7q31~32 (7 casos), 8q21 (7 casos) e 4q28~31 (5 casos). Este trabalho evidenciou que regiões cromossômicas com alterações em mais de um *locus* como no 4q12~13, que representa novo achado para este tipo de tumor. Onze pacientes do presente estudo apresentaram amplificação no braço longo do cromossomo 4 (4q). Seis paciente estão vivos e livres de doença : casos 3, 29, 35 e 40 fora de terapia e, casos 19 e 38 em terapia. O paciente nº 32 está vivo, com doença recidivada em pulmão. Dois pacientes faleceram em decorrência da nefrotoxicidade após uso de Methotrexate (casos 2 e 21). Um paciente foi a óbito por progressão de doença refratária à quimioterapia (caso 30) e, o único paciente que apresentou a alteração cromossômica descrita por **STOCK, 2000** (4q12~13) foi o paciente de nº 31, que faleceu por sepse durante episódio de neutropenia febril. Não foi definido neste estudo, o valor prognóstico das alterações no cromossomo 4, talvez pelo baixo número de casos estudados.

BOEHM, 2000 publicou em artigo de revisão da literatura, que as alterações genéticas mais freqüentemente encontradas nos OS são : amplificações no cromossomo 1 e deleções nos cromossomos 9, 10, 13 e 17, sendo menos freqüente na região 13q14 (*locus* do gene *RBI*). A alta instabilidade cromossômica, até então observada neste tipo de tumor, levou a procura de sofisticadas técnicas, onde a detecção mais precisa desta instabilidade, possa determinar qual dos genes poderá estar implicado na patogênese desta doença (**WANG, 2005**).

A técnica de hibridização genômica comparativa (*CGH*) em tumores sólidos foi pela primeira vez descrita por **KALLIONIEMI, 1992** , com o objetivo de analisar ganhos e perdas cromossômicas , como amplificações, deleções ou duplicações em diferentes *locus*,

não mapeados pela citogenética convencional. Este conhecimento levou ao melhor entendimento do polimorfismo dos osteossarcomas. Os osteossarcomas são geneticamente complexos, apresentando ganhos e perdas em sua sequência de DNA, envolvendo pelo menos uma e, mais freqüentemente, várias regiões de um mesmo cromossomo. A análise cromossômica pelo *CGH* realizada no presente estudo, documentou anomalias não detectadas nos estudos de genética convencional realizadas nos 41 pacientes deste grupo (Anexo II). Como esperado, as anormalidades foram muitas e variáveis, especialmente ganhos no cromossomo 1 (31/41 casos), sendo mais freqüentemente encontrada a amplificação em diferentes *locus* de 1p (60% dos casos), seguida de ganhos nos cromossomos 2p (26/41 casos), 5q (25/41 casos) e 6p e 3q (21/41 casos em cada um). Ainda na análise das amplificações encontradas pela técnica de *CGH* no cromossomo 5p, apesar de presente em apenas 10/41 casos, este ganho teve significado estatístico ($p=0,001$), quando comparado às demais alterações ocorridas nos outros cromossomos (tabela 15, página 104). Dos 10 casos que apresentaram amplificações envolvendo o cromossomo 5, quatro estão vivos e em remissão clínica completa (casos 3, 9, 18 e 28), 3 estão vivos em terapia (casos 20, 23 e 26), 1 está vivo com doença refratária (caso 5) e, 2 pacientes faleceram (o caso 27 por progressão de doença e o caso 39 por sepse). Num paralelo com o grau de necrose na peça cirúrgica dos 10 pacientes com amplificação do 5p, após uso de quimioterapia, 4 pacientes estão vivos e em remissão clínica completa. O paciente de nº 3 apresentou grau III de necrose, o caso 9 grau I de necrose, o caso 18 grau IV e o caso 28 grau II. Dentre os pacientes com amplificação 5p, 3 pacientes estão em terapia, sem evidência de doença ativa (casos 20, 23 e 26). Os casos 20 e 23 tiveram grau II de necrose e o caso 26, grau III. Destes 7 pacientes vivos, ainda em terapia mas, sem evidência de doença, seis possuem deleções nos genes *P53* e *RBI* (casos 3, 9, 18, 23, 26 e 28). Se a amplificação no cromossomo 5p ($p=0,001$), por um lado não se associou com maior grau de necrose, por outro associou-se à deleção dos genes *P53* e *RBI*, com sobrevida neste grupo específico de 85% em 7 anos de seguimento. Em outras palavras, talvez o envolvimento do cromossomo 5, isoladamente, nestes OS pediátricos possa estar relacionado ao melhor prognóstico.

As deleções, mencionadas na tabela 12 (páginas 98 a 100), nos 41 pacientes do estudo, ocorreram em vários cromossomos. O cromossomo 16 esteve envolvido em 75% dos casos, sendo 50% deles no *locus* -16p11.2. Três dos 8 casos com deleção -16p11.2 estão vivos e em remissão clínica completa (casos 6, 40 e 41); 2/8 estão vivos e em terapia (casos 16 e 37); 2 pacientes estão vivos, com tumor refratário à quimioterapia (casos 5 e 32) e um doente faleceu por progressão do tumor (caso 30). Três dos 5 pacientes vivos, sem evidência de doença ativa, também apresentaram a deleção nos genes *P53* e *RBI* (casos 6, 16 e 40), assim como, os 3 pacientes refratários (casos 5, 30 e 32). Entretanto, nessa situação, não temos como correlacionar o envolvimento do cromossomo 16 com o prognóstico dos pacientes neste estudo. Estes resultados são concordantes com os relatados por **BATANIAN, 2002**, que atribuiu esta alteração no cromossomo -16p ao subtipo histológico de alto grau de malignidade.

Considerando as alterações no cromossomo 14, em 16 pacientes a perda foi observada no *locus* -14q11.2. Desses, 6 estão vivos e em remissão clínica completa (casos 1, 6, 7, 35, 40 e 41) e 4 estão em terapia (casos 12, 16, 36 e 37). Um paciente está vivo e com doença em atividade (caso 5), 3 faleceram por progressão do tumor, refratário à quimioterapia (casos 14, 15 e 30) e, 2 pacientes foram a óbito por sepse durante episódio de neutropenia (casos 13 e 25). Dentre os 10 pacientes vivos, sem atividade do tumor, seis apresentaram deleção dos genes *P53* e *RBI* (casos 6, 7, 16, 35, 36, 40). Os 4 casos com refratariedade à terapia, também apresentaram deleção dos genes *P53* e *RBI* (casos 5, 14, 15 e 30). Não foi possível estabelecer o valor preditivo de alterações do cromossomo 14 nesta população estudada. O papel deste envolvimento no OS ainda está para ser definido.

Em 13 pacientes houve perda no braço longo do cromossomo 15 (-15q). Quatro pacientes estão vivos e livres de doença (casos 6, 11, 24 e 28); 2 pacientes estão em terapia e sem evidência de doença (casos 16 e 20); um paciente está vivo, mas com tumor refratário (caso 32) e 6 pacientes faleceram. Os óbitos decorreram de progressão do tumor (casos 14, 15 e 30) e por sepse (casos 17, 25 e 31). Dos pacientes vivos e sem evidência do tumor (casos 6, 11, 16, 24 e 28), todos apresentaram deleção dos genes *P53* e *RBI*, exceto o paciente nº 20, que está vivo e em terapia. Este último não apresentou alteração nesses genes. Não pudemos concluir que a deleção do -15q teve impacto na sobrevida destes

pacientes do estudo. Até o presente, não se definiu na literatura o papel prognóstico do envolvimento do cromossomo 15 nos pacientes com OS.

Os resultados do presente estudo evidenciaram, de modo pioneiro, o envolvimento do cromossomo 21 nos pacientes com OS. Merece destaque o fato deste achado não ser ocasional. Foi registrado em 70% dos casos. As anormalidades mais freqüentemente encontradas neste cromossomo (tabela 16, página 104) foram as deleções, presentes em 26 casos ($p=0,008$), sendo a -21q11.2 a deleção mais encontrada ($p=0,04$). Provavelmente, esta alteração não tem relação com o tipo histológico do tumor, uma vez que 85,4% dos casos eram do subtipo histológico osteoblástico. Dezoito pacientes apresentaram adicionalmente, deleção no gene *P53*. Vinte e dois pacientes apresentaram deleção do gene *RBI*. Dentre os pacientes com a presença da deleção -21q11.2 (25/26 casos), nove estão vivos, em terapia e sem evidência de doença (casos 12, 16, 19, 20, 23, 26, 36, 37, 38) e 9 pacientes estão fora de terapia (casos 1, 3, 7, 10, 11, 29, 35, 40 e 41). Dos 18 pacientes vivos, treze apresentaram deleções dos genes *P53* e *RBI* (casos 3, 7, 10, 11, 16, 19, 23, 26, 29, 35, 36, 38 e 40). É interessante mencionar o caso nº 36, que teve o diagnóstico de leucemia mielóide aguda após 2 anos da terapia do osteossarcoma. Foi submetido a novo esquema quimioterápico, entrando em remissão da segunda neoplasia; realizou transplante alogênico de medula óssea. A paciente estava viva e livre de doença no momento da análise deste estudo (dezembro de 2005). Infelizmente, faleceu por sepse secundária à pneumonia fúngica em janeiro de 2006.

O fato relevante da ocorrência do envolvimento do cromossomo 21 em 70% da população estudada, merece interpretação possivelmente epidemiológica no que concerne aos fatores raciais, ou de polimorfismo genético, ou mesmo, ambiental. Ressalta a idade inferior a 14 anos, observada em 84% dos pacientes com envolvimento do cromossomo 21. Ainda não temos explicação para estes achados. Estudos prospectivos com a técnica de *CGH* em outras populações de doentes brasileiros com OS, ou mesmo com retinoblastoma e tumor de Wilms, patologias estas com envolvimento dos cromossomos 13 e 1 e/ou 17, respectivamente, poderiam definir o possível envolvimento do cromossomo 21 na patogênese destes tumores.

ZIELENSKA, 2001, em análise de 17 amostras de osteossarcomas pediátricos, também pela técnica de *CGH*, identificou várias alterações cromossômicas. Em 5 desses casos, os tumores eram provenientes de pacientes brasileiros. As maiores alterações encontradas foram ganho no cromossomo 1p (10 casos) e ganho de parte ou em todo o cromossomo 19 (8 casos). Também foram observados ganhos no cromossomo 5p, em 3 casos (nenhum deles era brasileiro), 8q (3 casos), 16p (3 casos) e 17p (5 casos). Além disso, foram observadas perdas nos cromossomos 2q (3 casos), 10 (4 casos) e 13 (3 casos). O maior índice de ganho foi encontrado no cromossomo 8q23~24 em 2 pacientes e 17p em 2 casos, sendo um no tumor primário e um em metástase pulmonar. Outras regiões afetadas, em menor índice, foram com ganhos nos cromossomos 1p35~36.3 (8 casos), 5p14~15.2 (3 casos) e 8q22~24.3 (3 casos). Nenhum dos 17 casos, incluindo os pacientes brasileiros, apresentou perdas ou ganhos nos cromossomos 5 e 21.

A técnica de *CGH* possibilitou identificar alterações cromossômicas presentes nos 41 casos analisados, com precisão, determinando inclusive o *locus* envolvido nas aberrações cromossômicas dos OS. Estes pontos de perdas e ganhos cromossômicos nos permitiram conhecer nova deleção genética do tumor da nossa população, abrindo nova perspectiva no estudo da patogênese nos osteossarcomas.

6- CONCLUSÕES

1. A técnica de *CGH* mostrou-se sensível e precisa, fornecendo importantes informações adicionais aos exames de citogenética convencional, realizados em pacientes com OS.
2. A técnica de *CGH* detectou alteração no cromossomo 21 com deleção no braço longo (-21q) e no *locus* q11.2. Estas anormalidades foram as de maior frequência no grupo de estudo, com valores de $p=0,008$ e $p=0,04$, respectivamente, sugerindo seu envolvimento na patogênese do OS.
3. A deleção no cromossomo 21 observada em 70% dos pacientes do estudo, é achado inédito, de acordo com a literatura médica publicada.
4. A amplificação do braço longo do cromossomo 5 (5q) registrada pela técnica de *CGH*, teve significado estatístico ($p=0,001$) e, possivelmente, está relacionado à gênese deste tumor, e ao melhor prognóstico (85% dos pacientes estão vivos).
5. A deleção dos genes *P53* e *RBI* pela técnica de *FISH*, na população de estudo, foi verificada em 68,3% dos casos ($p=0,02$) e em 87,8% ($p=0,000001$), respectivamente, condescendente com a literatura, contribui na patogênese deste tumor.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO J, GARCIA-MIGUEL P, ABELAIRAS J, MENDIOLA M, PESTANA A. A microsatellite fluorescent method for linkage analysis in familial retinoblastoma and deletion detection at the RB1 locus in retinoblastoma and osteosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 9-14.

AL-ROMAIH K, BAYANI J, VOROBYOVA J, KARASKOVA J, PARK PC, ZIELENSKA M, SQUIRE JA. Chromosomal instability in osteosarcoma and its association with centrosome abnormalities. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2003; 144: 91-99.

BACCI G, BRICCOLI A, ROCCA M, FERRARI S, DONATI D, LONGHI A, BERTONI F, BACCHINI P, GIACOMINI S, FORNI C, MANFRINI M, GALLETTI S. 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. *Annals of Oncology* 2003; 14:1126-1134.

BACCI G, FERRARI S, BERTONI F, RIGGIERI P, PICCI P, LONGHI A, CASADEI R, FABBRI N, FORNI C, VERSARI M, CAMPANACCI M. Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at Instituto Ortopedico Rizzoli according to the Instituto ortopedico Rizzoli/ Osteosarcoma -2 protocol: an updated report. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18:4016-4027.

BACCI G, FERRARI S, LONGHI A. Delay in diagnosis of high grade osteosarcoma of the extremities. Has it any effect on the stage of the disease? *Tumori* 2000; 86: 204-206.

BACCI G, RUGGIERI P, BERTONI F, FERRARI S, LONGHI A, BIAGINI R, ZAVATTA M, VERSARI M, FORNI C. Local and systemic control for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy and limb salvage surgery: The Rizzoli experience. *Oncology Reports* 2000; 7:1129-1133.

BATANIAN JR, CAVALLI LR, ALDOSARI NM, MA E, SOTELO-AVILA C, RAMOS, MB, RONE JD, THORPE CM, HADDAD BR. Evaluation of paediatric osteosarcoma by classic cytogenetic and CGH analyses. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2002; 55: 389-393.

BAYANI J, ZIELENSKA M, PANDITA A. Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17 and 20 in osteosarcomas, *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36:7-16.

- BENTZ PLESCH,STILGENBAUER, DÖHNER, LICHTER. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes chromosomes Cancer* 1998; 21: 172-5.
- BIELACK SS, KEMPF-BIELACK B, DELLIN G. Prognostic factors in high grade osteosarcoma of the extremities or trunk: An analysis of 1702 patients treated on neo-adjuvant Co-operative Osteosarcoma study group protocols. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20: 776-790.
- BOEHM AK, NEFF JR, SQUIRE JA. Cytogenetic findings in 36 osteosarcoma specimens and a review of the literature. *Pediatr Pathol Mol Med* 2000; 19: 359-376.
- BRIDGE J, NELSON M, McCOMB E, McGUIRE M, ROSENTHAL H, VERGARA G, MAALE G, SPANIER S, NEFF J. Cytogenetic Findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 95: 74-87.
- BRINKSCHMIDT C, BLASIUS S, BURGER H, SIMON R, DIALLO R, BATTMANN A, WINKELMANN W, BOCKER W, DOCKHORN-DWORNICZAK B. Comparative genomic hybridization (CGH) for detecting a heretofore undescribed amplified chromosomal segment in high grade medullary osteosarcoma. *Verh dtsch Ges Pathol* 1998; 82:184-188.
- CADE S. Osteogenic sarcoma: a study base on 133 patients, *JR Coll Surg Edinb* 1955; 1: 79-111.
- CARBONE M, RIZZO P, PROCOPIO A. SV40-like sequences in human bone tumors, *Oncogene* 1996; 13: 527- 535.
- CHAUVEINC L, MOSSERI V, QUINTANA E, DESJARDINS L ,SCHLIENGER P, DOZ F, DUTRILLAUX B. Osteosarcoma following retinoblastoma: age at onset and latency period. *Ophthalmic Genet* 2001; 22:77-88.
- COLYER R. Osteogenic Sarcoma in siblings. *Johns Hopkins Med J* 1979; 145:131-135.
- COTTERILL SJ, WRIGHT CM, PEARCE MS, CRAFT AW, UKVMSG/MRC Bone tumors. Stature of young people with malignant bone tumors. *Pediatric Blood and Cancer* 2004; 42 : 59-63.

CRAFT AW. Osteosarcoma: Is big always worse ? *Pediatric Blood and Cancer* 2004; 43: 713-714.

ENTZ-WERLE N, SCHNEIDER A, KALIFA C, VOEGELI AC, TABONE MD, MAREC-BERARD P, MARCELLIN L, PACQUEMENT H, TERRIER P, BOUTARD P, MEYER N, GAUB MP, LUTZ P, BABIN A, OUDET P. Genetic alterations in primary osteosarcoma from 54 children and adolescents by target allelotyping. *British Journal of Cancer* 2003; 88:1925-1931.

FERRARI S, BERTONI F, ZANELLA L, SETOLA E, BACCHINI P, ALBERGHINI M, VERSARI M, BACCI G. Evaluation of p-Glycoprotein HER-2/ErbB2 p53 and Bcl-2 in Primary Tumor and Metachronous Lung Metastases in Patients with High-Grade Osteosarcoma. *Cancer* 2004; 100 : 1936-1942.

FERRARI S, BERTONI F, MERCURI M, PICCI P, GIACOMINI S, LONGHI A, BACCI G. Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of extremity: an analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute. *Annals of Oncology* 2001; 12: 1145-1150.

FOREST M, DE PINIEUX G, KNUUTILA S. WHO Classification. *Pathology & Genetics Tumors of soft tissue and bone* pages 264-286. Edited by Christopher DM, Fletcher K, Krishman U, Mertens F. IARC Press: Lyon, 2002.

FORUS A, WEGHUIS DO, SMEETS D, FODSTAD O, MYKLEBOST O, van KESSEL A. Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas : II. Identification of novel amplification at 6p and 17p in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 14:15-21.

FRIEND SH, BERNARD SR, ROGEL JS. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986;323:643-646.

GOKGOZ N, WUNDER JS, MOUSSES S. Comparison of p53 mutations in patients with localized osteosarcoma and metastatic osteosarcoma. *Cancer* 2001; 92: 2181-2189.

GRANA X, GARRIGA J, MAYOL X. Role of the retinoblastoma protein family pRb, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 1998; 17: 3365-3383.

- GURNEY JG, SWENSEN AR, BULTERYS M. Malignant bone tumors, In: RIES LAG, SMITH MA, GURNEY JG eds. Cancer Incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995, Bethesda MD: National Cancer Institute SEER Program. NIH Pub. N° 99-4649, 1999: 99-110.
- HAINAUT P, SOUSSI T, SHOMER B, HOLLSTEIN M, GREENBLATT M, HOUIG E, HARRIS C, MONTES R. Database of p53 gene somatic mutations in humans tumors and cell lines : update compilation and future prospects. Nuclei Acids research 1997; 25: 151-157.
- HASELOW RE, NESBIT M, DEHNER LP. Second neoplasms following megavoltage radiation in a pediatric population. Cancer 1978; 42:1185-1191.
- HEIM S, MITELMAN F. Cancer Cytogenetics 2nd. New York City. NY, John Wiley & Sons.
- HOWARD D, DORFMAN HD, CZERNIAK B. Bone Tumors. Chapter 5, pages 128-252, Edited by St, Louis Mosby 1998.
- HUVOS AG. Bone tumours: diagnosis treatment and prognosis, 2nd ed, Philadelphia: WB Saunders 1991.
- HUVOS AG, ROSEN G, MARCOVE RC. Primary osteogenic sarcoma. Pathologic aspects in twenty patients after treatment with chemotherapy in bloc resection and prosthetic bone replacement. Arch Pathol Lab Med 1977;101: 14-18.
- IIDA K, NOBORI T, MATSUMINE A, ISAKA A, SETO M, SHIRAISHI T, UCHIDA A. Effect of retinoblastoma tumor suppressor gene expression on chemosensitivity of human osteosarcoma cell lines. Oncology Reports 2003; 10: 1961-65.
- JORDE LB, CAREY JC, BAMSHAD MJ, WHITE RL. Genética Médica, In: Citogenética Clínica: A base cromossômica das doenças humanas 2000, 2ª edição Guanabara Koogan pg 97-121.
- KAGER L, ZOUBEK A, PÖTSCHGER U, KASTNER U, FLEGE S, KEMPF-BIELACK B, BRANSCHIED D, KOTZ R, SALZER-KUNTSCHICK M, WINKELMANN W, JUNDT G, KABISCH H, REICHARDT P, JÜRGENS H, GADNER H, BIELACK S. Primary Metastatic Osteosarcoma: Presentation and Outcome of Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. Journal of Clinical Oncology 2003; 10: 2011- 2018.

KALIL R, BRIDGE JA. Small cell osteosarcoma, In: Fletcher CDM Unni KK, Mertens F, eds. WHO Classification of Tumors: Pathology and Genetics of tumours of Soft Tissue and Bone. Lyon France: IARC Press 2002: 273-274.

KALLIONIEMI OP, KALLIONIEMI A, PIPER J, ISOLA J, WALDMAN FM, GRAY JW, PINKEL D. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequences copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;10:231-43.

KALLIONIEMI A, KALLIONIEMI OP, SUDAR D et al. Comparative genomic Hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258: 818-821.

KAPLAN EL, MEIER P. Non-parametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457 – 81.

KASTE SC, LIU T, BILLUPUS CA, DAW NC, PRATT C, MEYER WH. Tumor Size as a Predictor of Outcome in Pediatric Non-Metastatic Osteosarcoma of the Extremity. *Pediatric Blood and Cancer* 2004; 43: 723-728.

KRUZELOCK RP, MURPHY EC, STRONG LC. Localization of a novel tumor supressor locus on human chromosome 3q important in osteosarcoma tumorigenesis. *Cancer Research* 1997; 57: 106-109.

KUUTILA S, BJÖRKQVIST AM, AUTIO K, TARKKANEN M, WOLF M, MONNI O, SZYMANSKA J, LARRAMENDY M, TAPPER J, PERE H, EL-RIFAI W, HEMMER S, WASENIUS VM, VIDGREN V, ZHU Y. DNA copy number amplification in human neoplasms. Review of Comparative Genomic hybridization Studies. *American Journal of Pathology* 1998 ; 152:1107-1123.

LADANYI I, GORLICK R. Molecular Pathology and Molecular pharmacology of Osteosarcoma, *Pediatr Pathol Mol Med* 2000;19:391-413.

LAU CC, HARRIS CP, LU XY, PERLAKY L, GOGINENI S, CHINTAGUMPALA M, HICKS J, JOHNSON ME, DAVINO NA, HUVOS AG, MEYERS PA, HEALY JH, GORLICK R, RAO PH. Frequent amplification and rearrangement of chromosomal bands 6p12-p21 and 17p11.2 in osteosarcoma, *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 11-21.

LINK M, GEBHARD TM, MEYER SP. Osteosarcoma. In: Principles and Practice of Pediatric Oncology by Pizzo P and Poplack D, 2006; chapter 35 pages 1074-1115, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins.

MALKIN D, LI FP, STRONG C, FRAUMENI JFJ, NELSON CE, KIM DH, KASSEL J, GRYKA MA, BISCHOFF FZ, TAINSKY MA, Germline p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer sarcomas and other neoplasms. Science 1990; 250: 1233-1238.

MAN TK, LU XY, JAEWEON K, PERLAKY L, HARRIS CP, SHAH S, LADANYI M, GORLICK R, LAU CC, RAO PH. Genome-wide array comparative genomic hybridization analysis reveals distinct amplifications in osteosarcoma. BMC Cancer 2004; 4: 45, www.biomedcentral.com

MANIATIS T, FRITSH EF, SAMBROOCK J. Gel electrophoresis of DNA, In: Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed, Cold Spring NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

MARINA N, GEBHARDT M, TEOT L, GORLICK R. Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma. The Oncologist 2004; 9: 422-441.

MATSUNO T, OKADA K, KNUUTILA S. Teleangiectatic osteosarcoma, In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F eds. WHO Classification of Tumours of Soft tissue and Bone, Lyon France: IARC Press 2002: 273 -274.

MENDOZA SM, KONISHI T, MILLER CW. Integration of SV40 in human osteosarcoma DNA. Oncogene 1998; 17: 2457-2462.

MERTENS F, LARRAMENDY M, GUSTAVSSON A, GISSELSSON D, RYDHOLM A, BROSSO O , MIETELMAN F, KNUUTILA S, MANDAHL N. Radiation-associated sarcomas are characterized by complex karyotypes with frequent rearrangements of chromosome arm 3p. Cancer genetics and cytogenetics 2000; 116:89-96.

MITELMAN F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. Mutat Res 2000; 462: 247-253.

NAKASHIMA H, NISHIDA Y, SUGIURA H, KATAGIRI H, YONEKAWA M, YAMADA Y, IWATA H, NAGASAKA T, ISHIGURO N. Telomerase p53 and PCNA activity in osteosarcoma. European Journal of Surgical Oncology 2003; 29: 564-567.

OVERHOLTZER M, RAO PH, FAVIS R, LU XY, ELOWITZ MB, BARANY F, LADANYI M, GORLICK R, LEVINE A. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Genetics PNAS* Sep 2003; 100 : 11547-11552.

OZAKI T, FLEGE S, KEVRIC M. Osteosarcoma of the pelvis: experience of the Cooperative Osteosarcoma Study Group. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21:334-341.

OZAKI T, NEUMAN N , WAI D, SCHÄFER KL, VAN VALEN F, LINDNER N, SCHEEL C, BÖCKER W, WINKELMANN W, DWORNICZAK BD, HORST J, POREMBA C. Chromosomal alterations in osteosarcoma cell lines revealed by comparative genomic hybridization and multicolor karyotyping. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2003; 140: 145 – 152.

OZAKI T, SCHAEFER KL, WAI D, BUERGER H, FLEGE S, LINDNER N, KEVRIC M, DIALLO R, BANKFALVI A, BRINKSCHMIDT C, JÜRGENS H, WINKELMANN W, DOCKHORN-DWORNICZAK B, BIELACK S, POREMBA C. Genetic Imbalances revealed by comparative genomic hybridization in osteosarcomas. *Int J Cancer* 2002; 102:355-365.

PATÍÑO-GARCÍA A, PIÑEIRO ES, DÍEZ MZ, ITURRIAGAGOITIA LG, KLÜSSMANN FA, ARIZNABARRETA LS. Genetic and Epigenetic Alterations of Cell Cycle Regulators and Tumor Suppressor Genes in Pediatric Osteosarcomas. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 2003; 25: 362-367.

PETRILLI A, PEREIRA K, PEREIRA W , AMARAL E, TONE L, SOUZA M, RODRIGUES K, MENDES W, MACHADO T, DIZ M, BORSATO M, BRUNETTO A, CALHEIROS L, LOGGETTO S, BARRETO J, ARAÚJO S, RODEL M, PONTES E, VIANNA S, MASTELLARO M, CARVALHO E, LUSTOSA D, NÓBREGA A, MACEDO M. Osteosarcoma 2000. Preliminary Results of the Brazilian Cooperative Group. *SIOP XXXV Meeting – Abstracts (O099). Medical and Pediatric Oncology*, 2003 October.

- PETRILLI A, PEREIRA K, PEREIRA W , AMARAL E, TONE L, SOUZA M, RODRIGUES K, MENDES W, MACHADO T, DIZ M, BORSATO M, BRUNETTO A, CALHEIROS L, LOGGETTO S, BARRETO J, ARAÚJO S, RODEL M, PONTES E, VIANNA S, MASTELLARO M, CARVALHO E, LUSTOSA D, NÓBREGA A, MACEDO M. Osteosarcoma 2000. Preliminary Results of the Brazilian Cooperative Group. ASCO – Abstracts (3218). ASCO Proceedings, Journal and Clinical Oncology, 2003.
- PHILLIPS T, SHELINE G. Bone sarcomas following radiation therapy. *Radiology* 1963; 81: 992-99.
- PINKEL D, SEGRAVES R, SUDAR D, CLARK S, POOLE I, KOEBEL D, COLLINS C, KUO WL, CHEN-ZAI Y, DAIRKEE SH, GRAY JW, ALBERTSON D. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genet* 1998; 20: 207-211.
- PIPER J. Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 1995; 19:10-26.
- PIZZO PA, POPLACK DG. Osteosarcoma eds, Principles and Practice of Pediatric Oncology 2002, Chapter 35 4th edition, Philadelphia: Lippincott William and Wilkins.
- PRICE CH. Primary bone-forming tumours and their relationship to skeletal growth. *J Bone Joint Surg Br* 1958; 40: 574-593.
- RAGLAND BD, BELL WC, LOPEZ RR, SIEGAL GP. Laboratory Investigation. 2002;82:365-373.
- RAYMOND AK, AYALA AG, KNUUTILA S. Conventional osteosarcoma. In: Kleihues P, Sobin L, Fletcher C et al, eds. WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone, Lyon France, IARC press 2002: 264-270.
- ROSEN G, FORSCHER CA, MANKIN HJ. Neoplasms of bone and soft tissue: bone tumors. In: Bast RCJ, Kufe DW, Pollock RE et al, eds. Cancer Medicine 5th edition, Hamilton Canada: BC Decker Inc 2000, pg 1870- 1902.

ROSEN G, NIRENBERG A, CAPARROS B. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: Selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumour to preoperative chemotherapy. *Cancer* 1982; 49:1221-1239.

SAGERMAN RH, CASSADY JR, TRETTE RP. Radiation induced neoplasia following external beam therapy for children with retinoblastoma. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1969; 105:529-535.

SANDBERG AA, BRIDGE JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: osteosarcoma and related tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 140: 1-12.

SETH A, PAPAS T. Principles of Molecular Cell Biology of Cancer, general Aspects of Gene Regulation, In: Principles and Practice of Oncology JB Lippincott Company 1993, Chapter 2 pg 32-33 4th edition De Vitta Jr V Hellman S Rosenberg S.

SQUIRE JA, PEI J, MARRANO P, BEHESHTI B, BAYANI J, LIM G, MOLDOVAN L, ZIELENSKA M. High resolution Mapping of amplification and deletions in pediatric osteosarcomas by use of CGH analysis of cDNA microarrays. *Genes Chromosomes & Cancer* 2003; 38: 215 – 225.

STOCK C, KAGER L, FINK FM, GADNER H, AMBROS PF. Chromosomal regions involved in pathogenesis of osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 28: 329-336.

SWANLEY J. Familial osteogenic osteosarcoma. *Clin Orthop* 1973; 97: 64-68.

SZYMANSKA J, MANDAHN N, MERTENS F, TARKKANEN M, KARAHARJU E, KNUUTILA S. Ring chromosomes in parosteal osteosarcoma contain sequences from 12q13~15: combined cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Genes chromosomes cancer* 1996; 16:31-34.

TARKKANEN M, ELOMA AI, BLOMQVIST C, KIVIOJA A, KELLOKUMPU-LEHTINEN P, BÖHLING T, VALLE J, KNUUTILA S. DNA sequence copy number increase at 8q: a potential new prognostic marker in high-grade osteosarcoma. *Int J Cancer (Ped Onc)* 1999; 84:114-121.

- TARKKANEN M, BOHLING T, GAMBERI G, RAGAZZINI P, BENASSI MS, KIVIOJA A, KALLIO P, ELOMAA I, PICCI P, KNUUTILA S. Comparative genomic hybridization of low grade central osteosarcoma. *Mod Pathol* 1998; 11:421-426.
- TARKKANEN M, KARHU R, KALLIONIEMI A, ELOMAA I, KIVIOJA A, NEVALAINEN J, BÖHLING T, KARAHARJU E, HYYTINEN E, KNUUTILA S, KALLIONIEMI O. Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Research* 1995; 31:1334-1338.
- TJALMA RA. Canine bone sarcoma: estimation of relative risk as a function of body size. *J Natl Cancer Inst* 1966; 36: 1137-1150.
- TRIEB K, KOTZ R. Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2001; 33:11-17.
- TSUCHIYA H, KANAZAWA Y, ABDEL-WANIS ME. Effect of timing of pulmonary metastases identification on prognosis of patients with osteosarcoma: The Japanese Musculoskeletal Oncology Group Study. *Journal of Clinical Oncology* 2002; 20: 3470-3477.
- TUCKER MA. Risk factors for the occurrence of leukemia and bone sarcoma as second malignant tumors. *International Conference on Complications of Treatment of Children* 1990: 13.
- TUCKER MA, D'ANGIO GJ, BOICE JD Jr. Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children. *N Engl J Med* 1987; 317: 588-593.
- van DARTEL M, HULSEBOS TJM. Amplification and overexpression of genes in 17p11,2~p12 in osteosarcoma. *Cancer Genetics* 2004; 153:77-80.
- VARELLA-GARCIA M. Molecular Cytogenetics in Solid Tumors: Laboratorial Tool for Diagnosis Prognosis and Therapy. *The Oncologist* 2003; 8:45-58, www.TheOncologist.com.
- VERGOTE J, MORETTI JL, DE VRIES EGE, GARNIER-SUILLEROT A. Comparison of the kinetics of active efflux of ^{99m}Tc - MIBI in cells with P-glycoprotein-mediated and multidrug-resistance protein-associated multidrug-resistance phenotypes. *Eur J Biochem* 1998; 252: 140-146.

- WANG L. Biology of Osteogenic Sarcoma. *The Cancer Journal* 2005; 11:294-305.
- WEATHERBY RP, DAHLIN DC, IVINS JC. Postradiation sarcoma of the bone: review of 78 Mayo Clinic cases. *Mayo Clin Proc* 1981; 56: 294-306.
- WOLF G, ROTH K, SCHWENDEL A, PETERSEN S, BOUEMÜHL U. The CGH Group Methods. Institute of Pathology Rudolf-Virchow-Hous, University Hospital Charité, Humboldt University of Berlin. <http://amba.charite.de/cgh/>
- YAMAGUCHI T, TOGUCHIDA J, YAMAMURO T. Allelotype analysis in osteosarcomas: frequent allele loss on 3q, 13q, 17p and 18q. *Cancer Res*; 1992 52: 2419-2423.
- ZIELENSKA M, BAYANI J, PANDIRA A, TOLEDO S, MARRANO P, ANDRADE J, PETRILLI AS, THORNER P, SORENSEN P, SQUIRE JA. Comparative genomic hybridization analysis identifies gains of 1p35-36 and chromosome 19 in osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; 130: 14-21.

8- *ANEXOS*

ANEXO I

FICHA DE CONSENTIMENTO

Nós, pais do(a) menor _____
portador(a) de osteossarcoma, diagnosticado(a) e tratado(a) no Centro Infantil Boldrini, no período de 1999 até 2005, autorizamos a Dra. Simone dos Santos Aguiar, sob a orientação da Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise, a utilizar o material proveniente da biópsia diagnóstica de nosso(a) filho(a) para a realização de estudos de citogenética com o objetivo de pesquisar as alterações existentes neste tumor que possam determinar o prognóstico evolutivo deste tipo de câncer. Estamos de acordo, também, na publicação destes resultados em revistas médicas, onde o nome de nosso(a) filho(a) será preservado.

Campinas, ____ de _____ de 200__.

Pai

Mãe

Testemunha

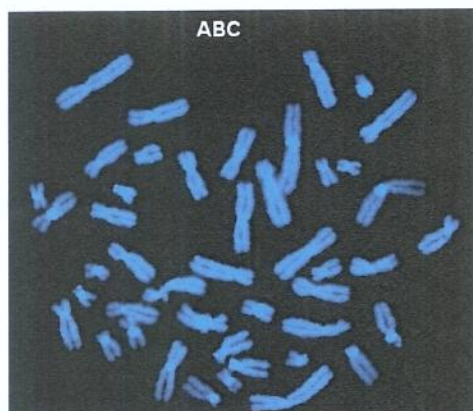
Testemunha

ANEXO II

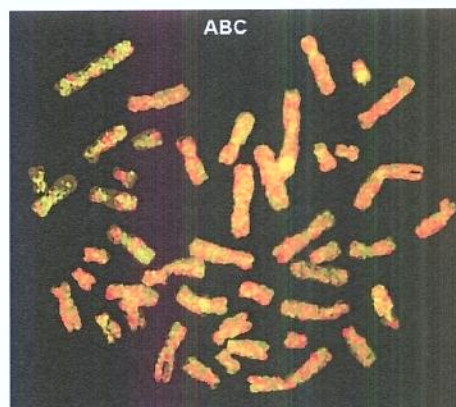
ILUSTRAÇÕES DOS CASOS DE 1 A 41

Caso 1: ABC

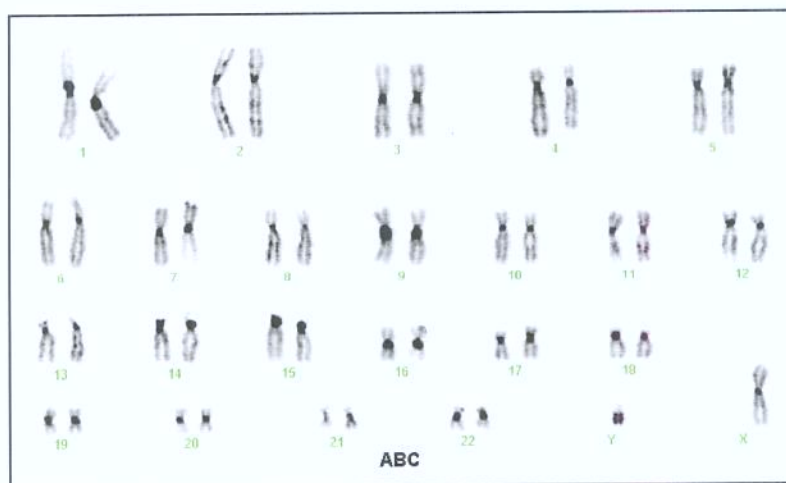
Resultado: +1p32~31, +2q21, +6q16, +12q12~13, -14q11.2~q12, -16p12~p11.2, -21q11.2~q21



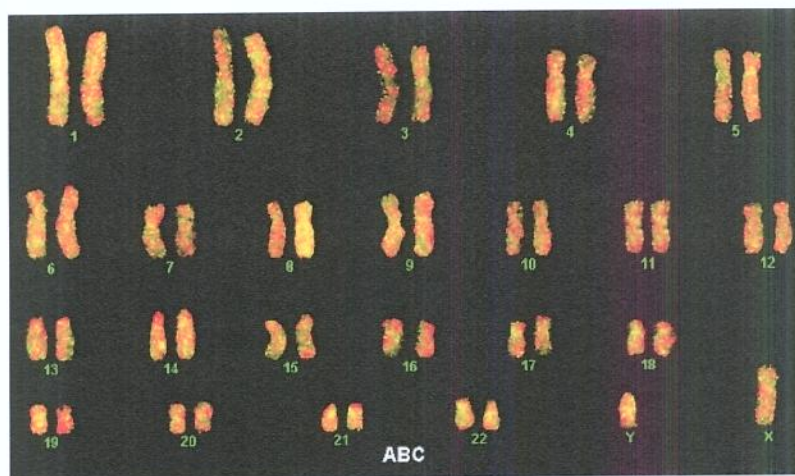
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



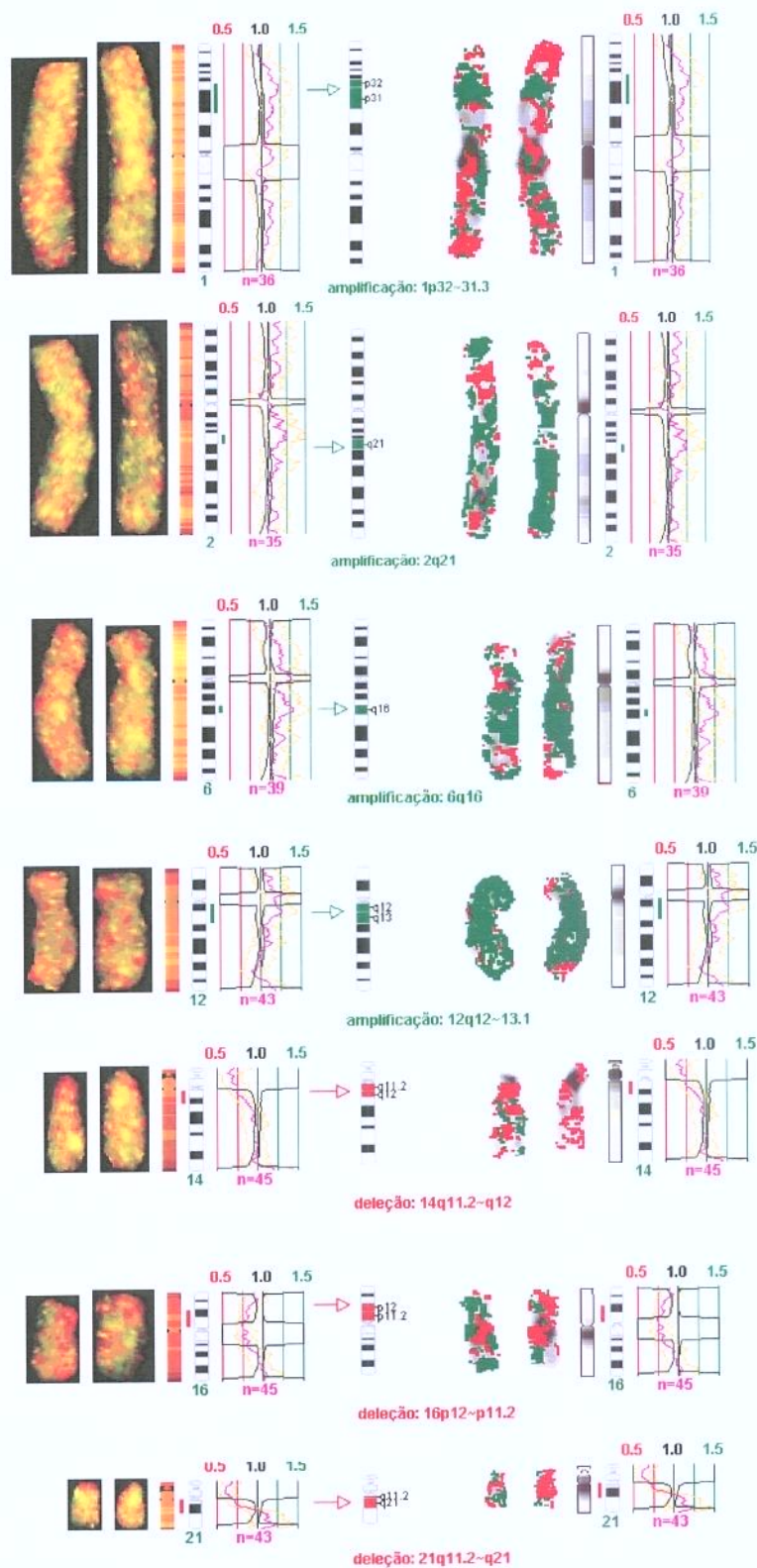
Cariótipo DAPI invertido



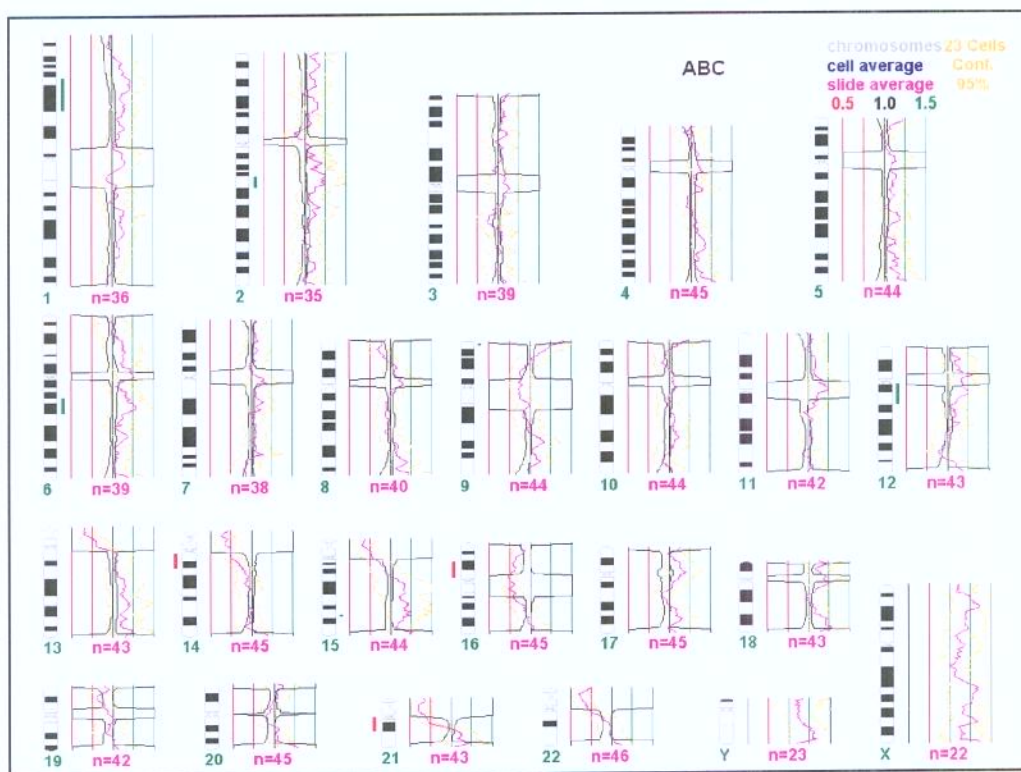
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Caso 1: ABC

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



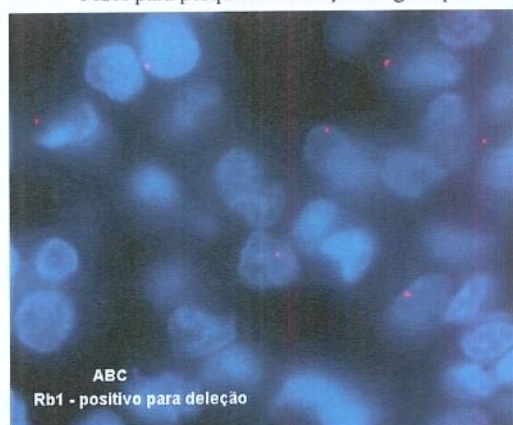
Caso 1: ABC



Profile



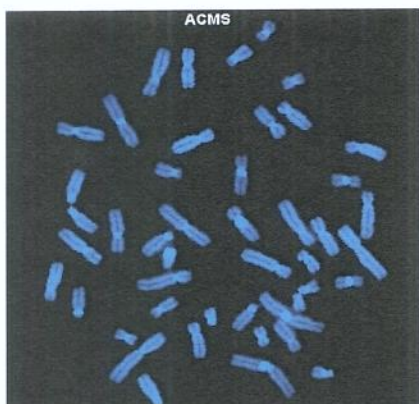
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



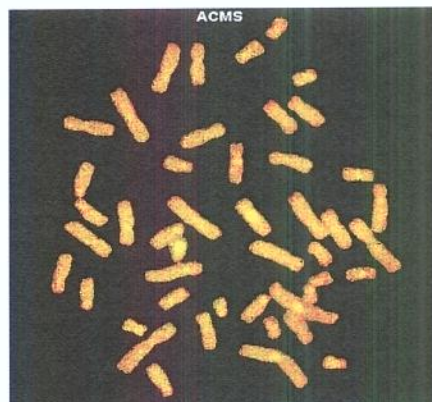
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 2 : ACMS

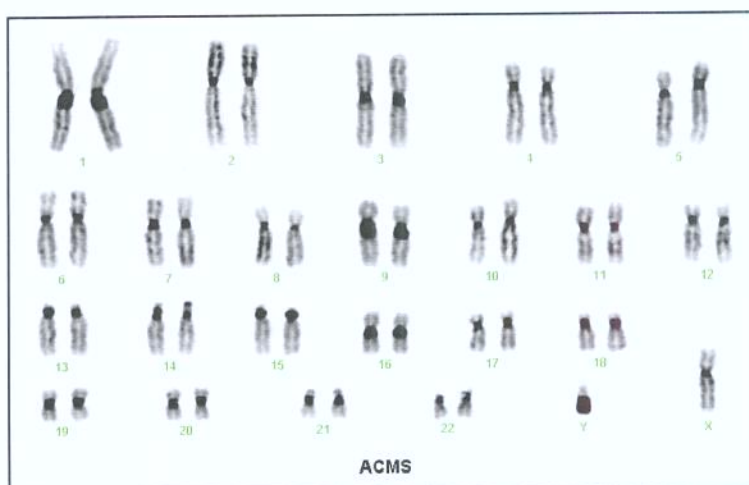
Resultado: +1q21~q32, +2q32~q35, +3p21~q27, +4q12~q31.3, -5q35, +6p21.3~q21, 8q23~qter, +10q24~qter, +11q13, +12q24, +13q22, -16p12~p11.2, -21q11.2, +22q12~qter



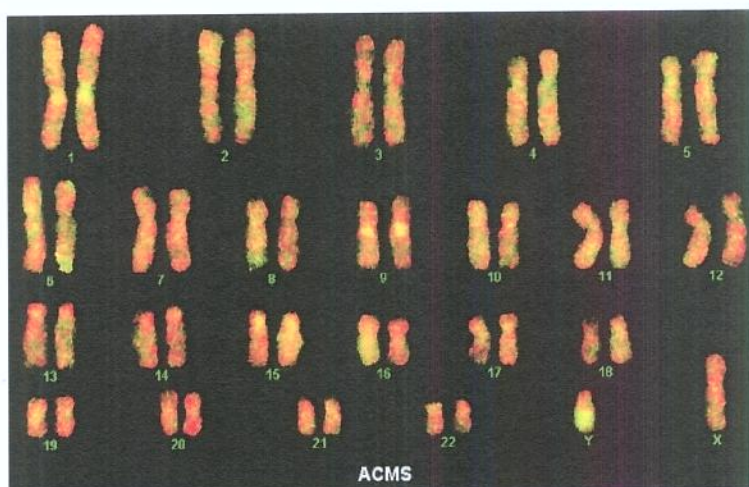
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



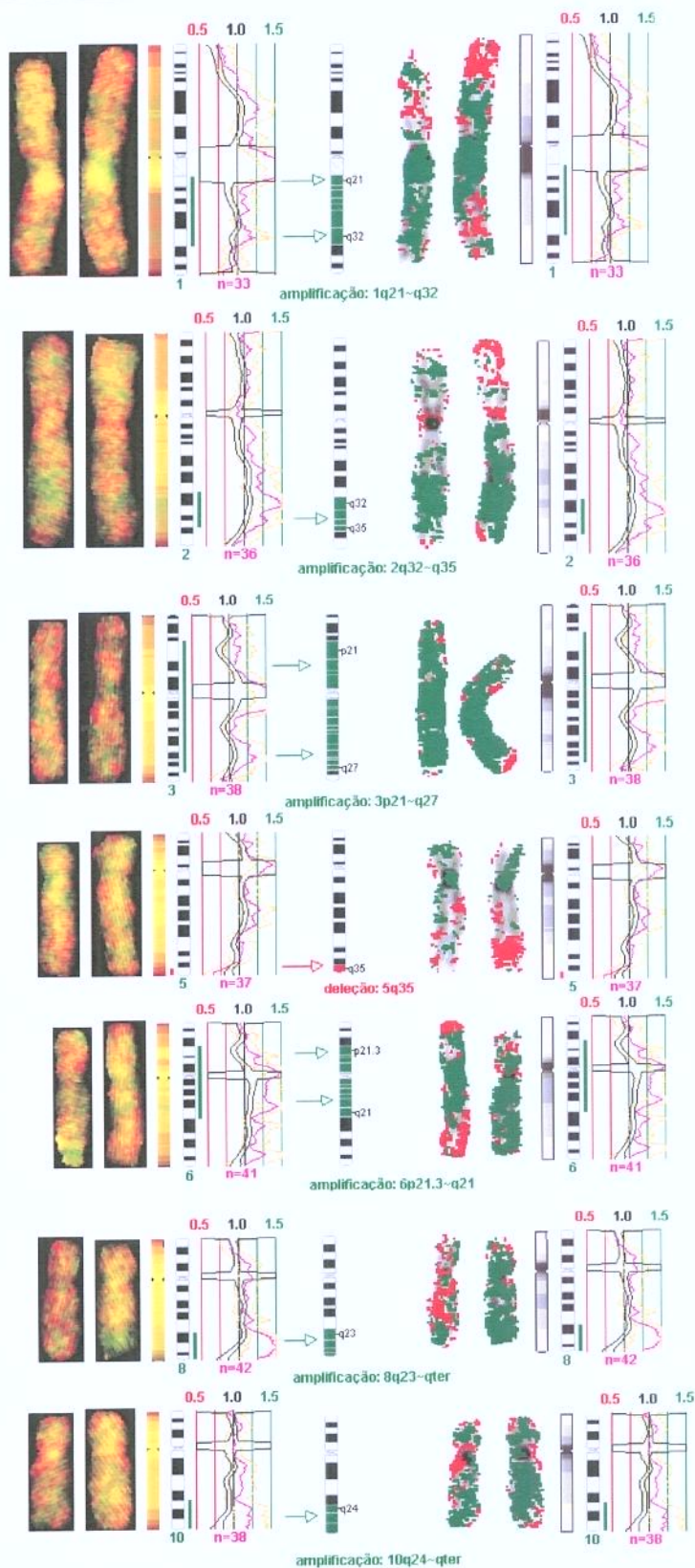
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

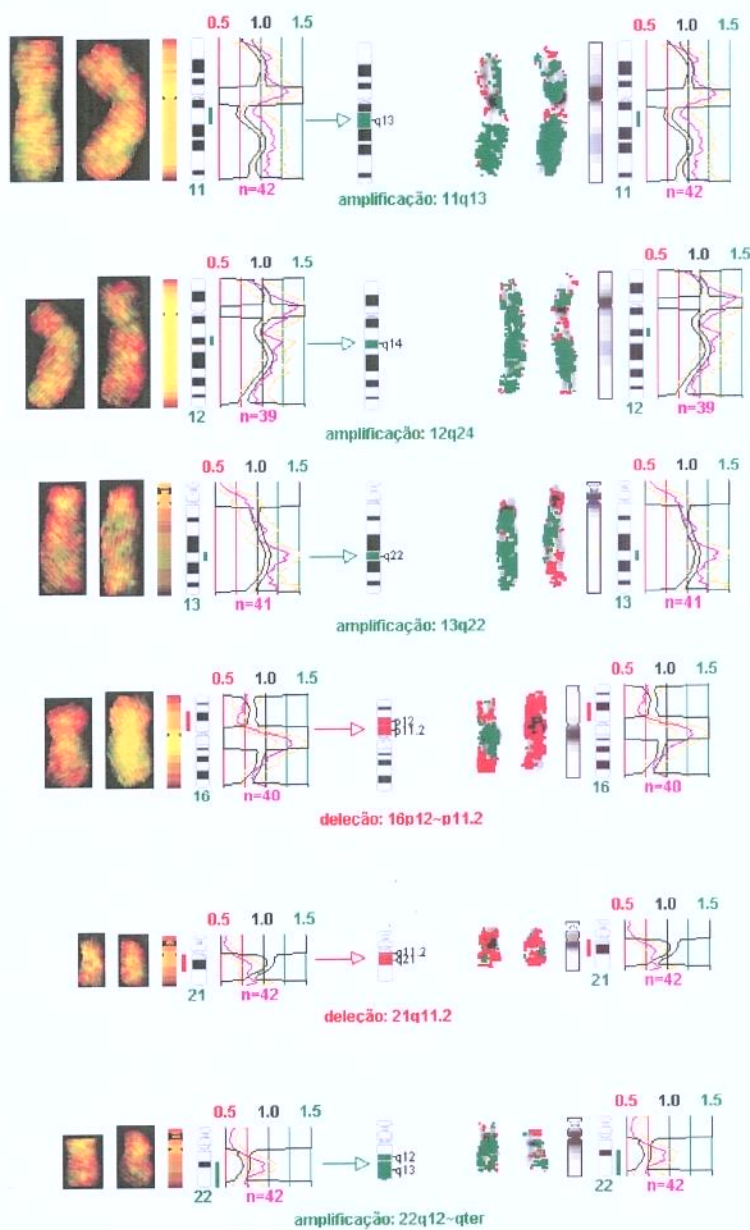
Caso 2: ACMS

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

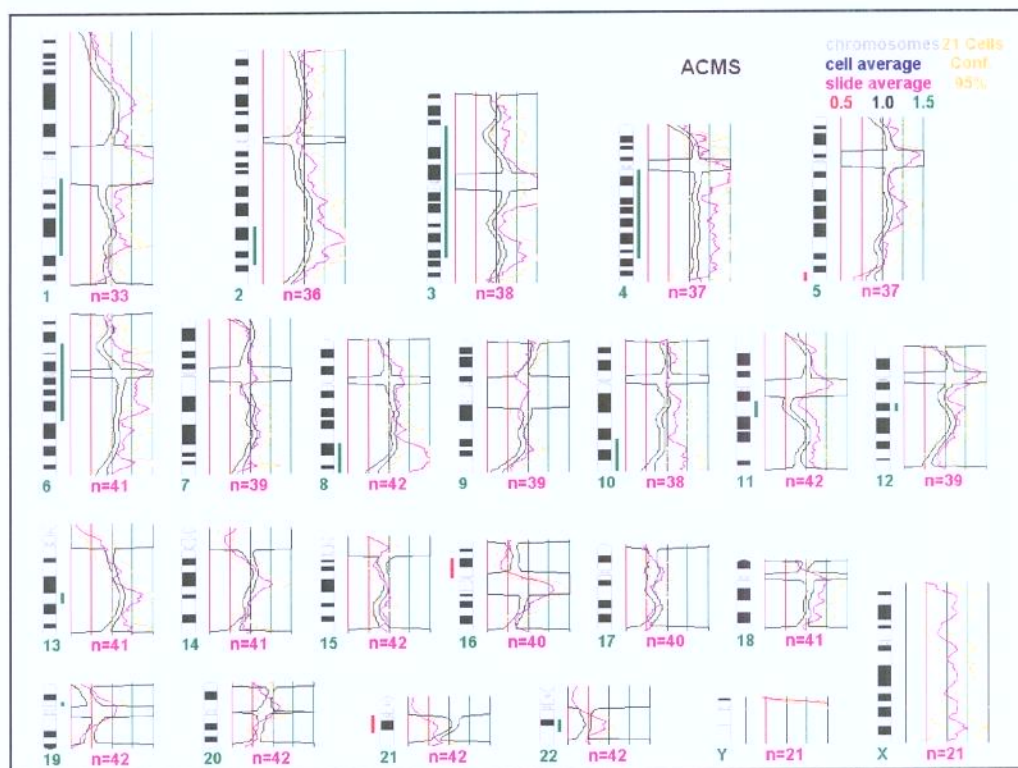


Caso 2: ACMS

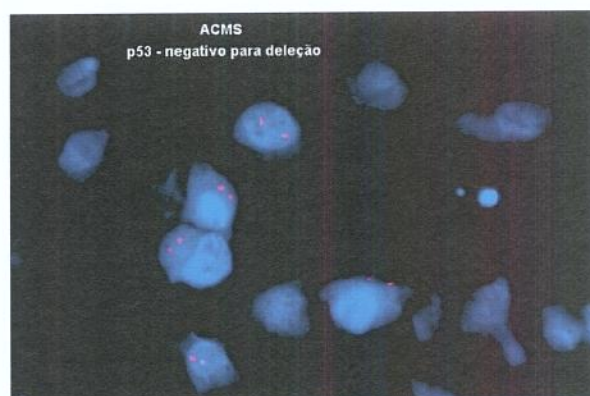
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



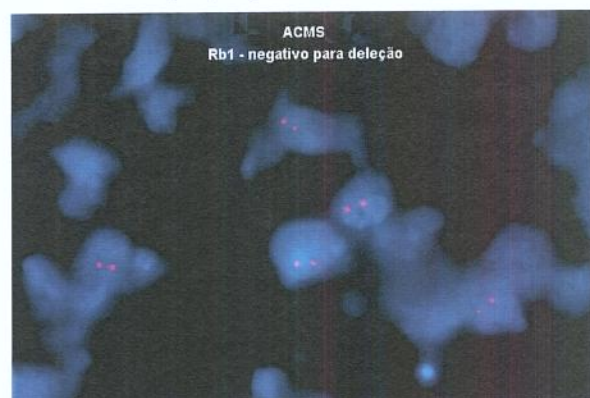
Caso 2: ACMS



Profile



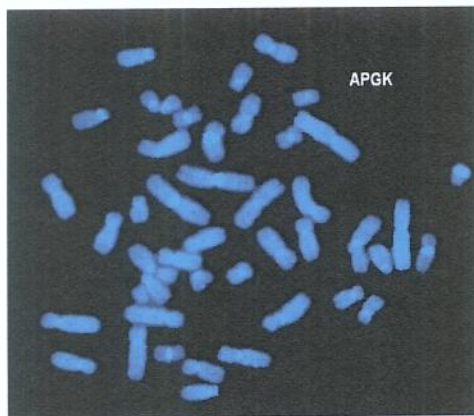
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



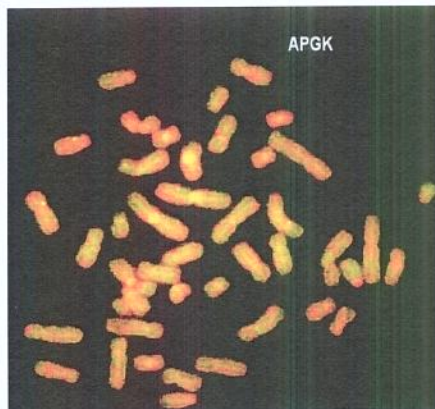
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 3: APGK

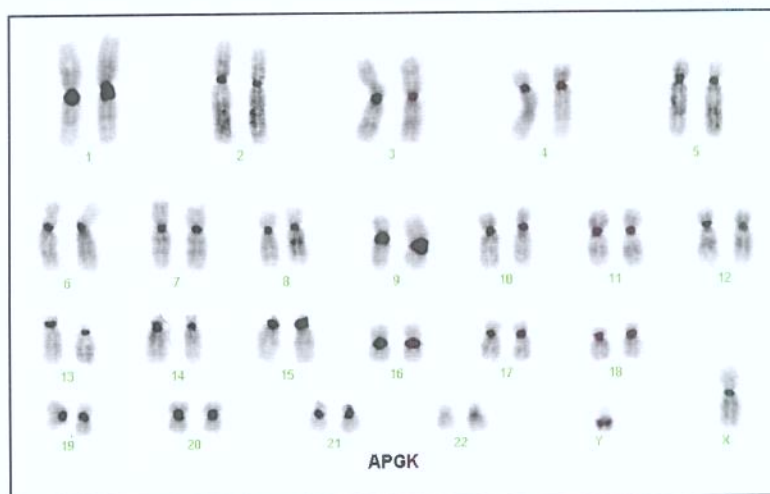
Resultado: +1p34.2~p13,+1q21~q41,+2p24~pter,+3q12~q13.1,+4q23~q26,+5p15.1~ter,
+6p12~q12,+7q11.2,+8q24.1~qter,+11q14~qter,+12p11.2~p12,+12q14~q15,
+13q21~qter,-16p13.1,+18p11.2~q22,-21q11.2~q21



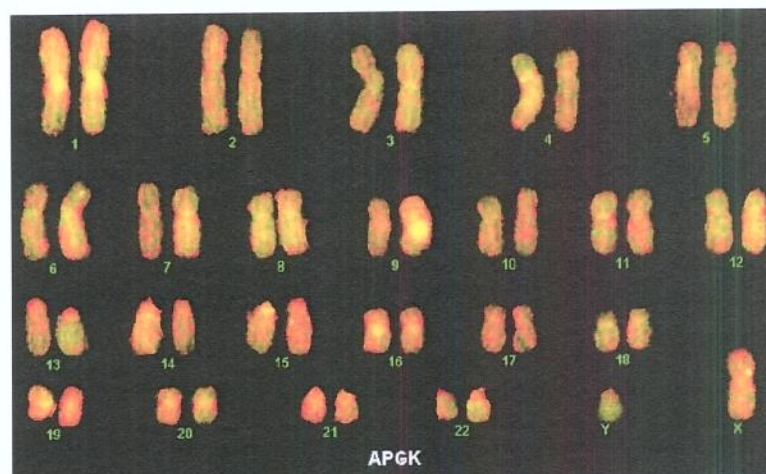
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



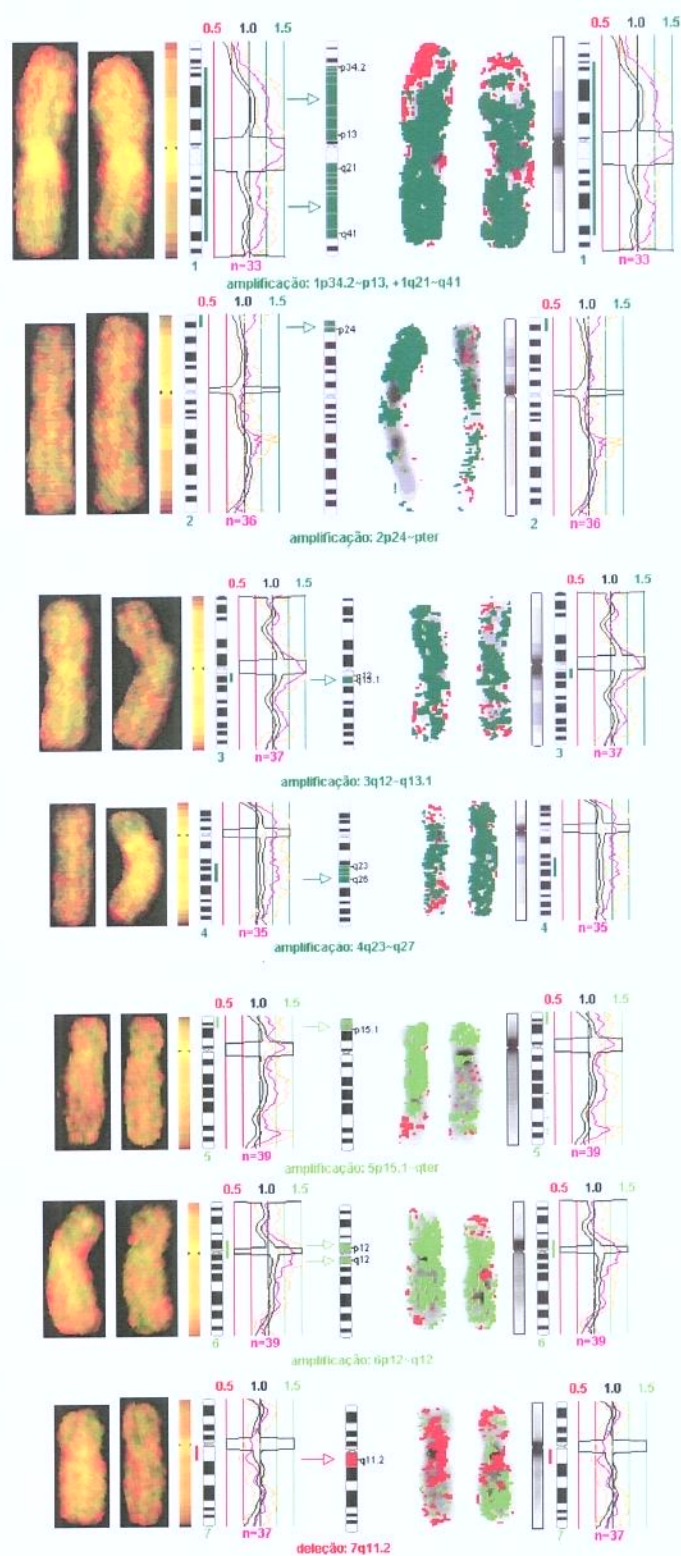
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

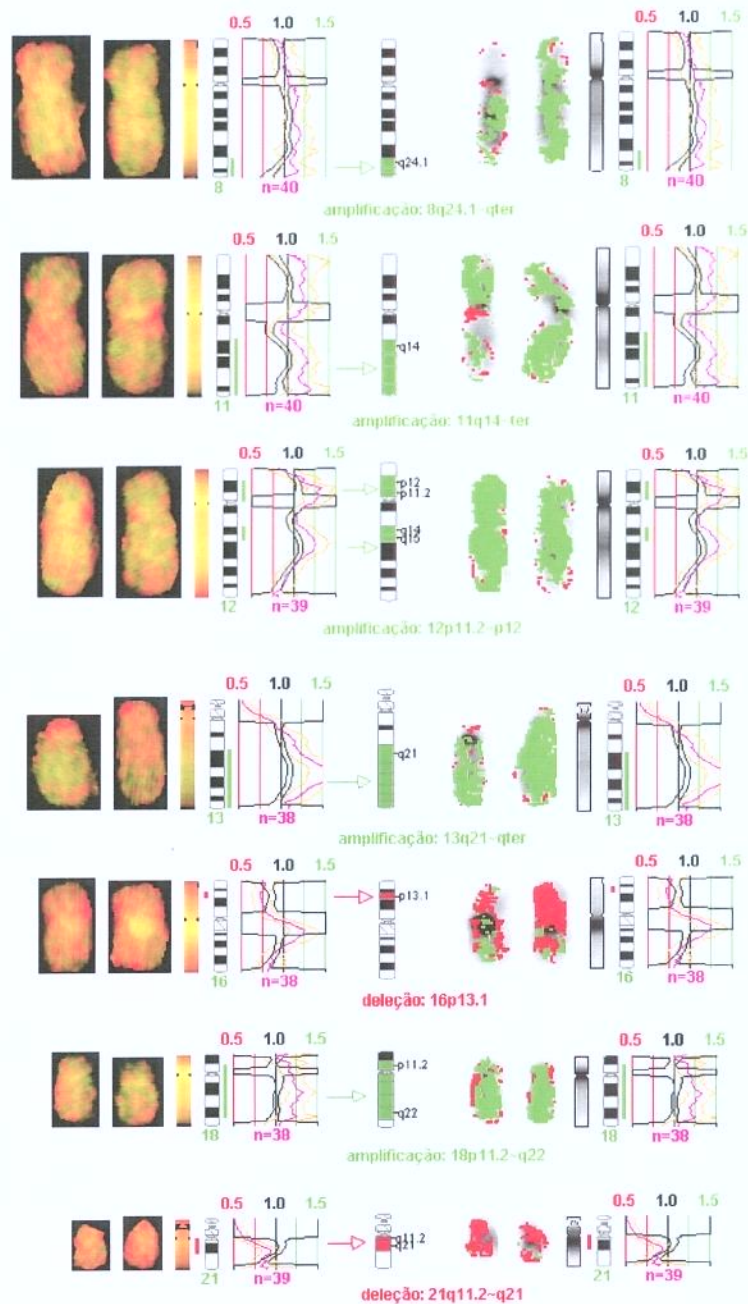
Caso 3: APGK

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

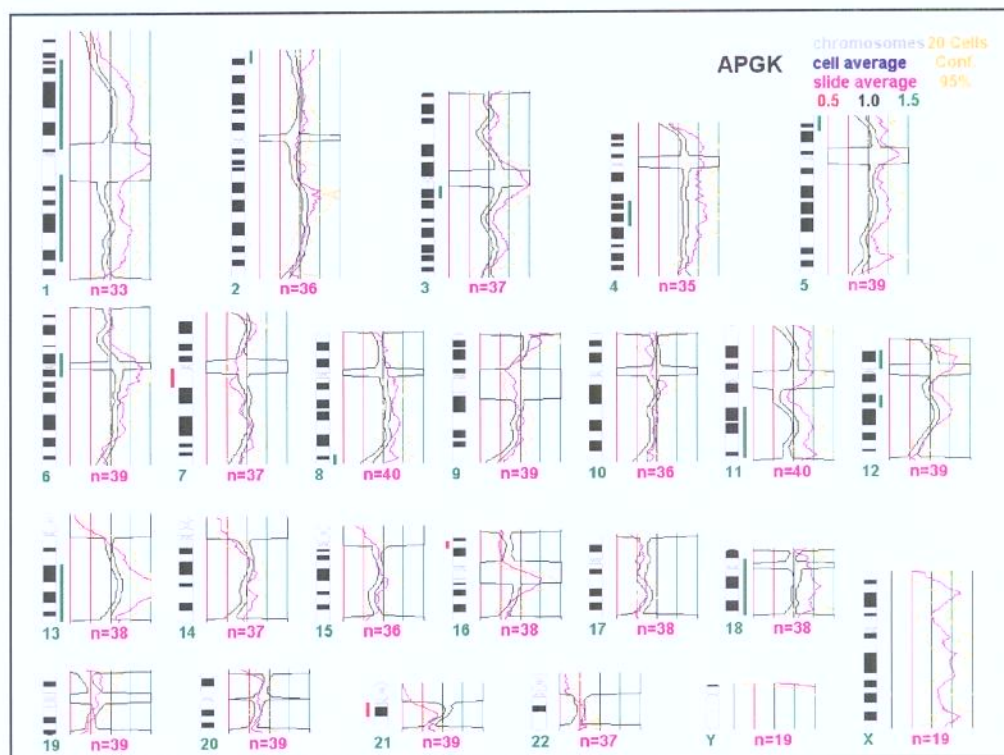


Caso 3 : APGK

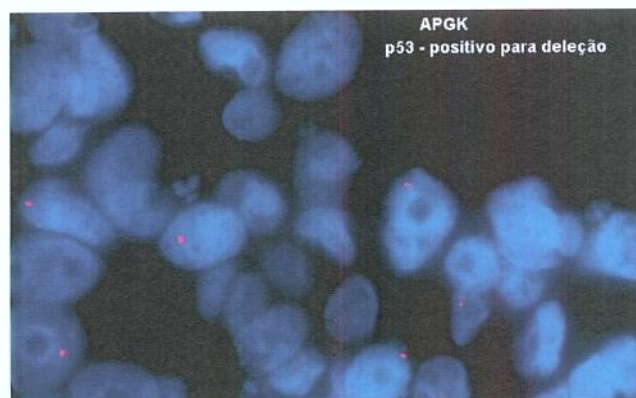
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



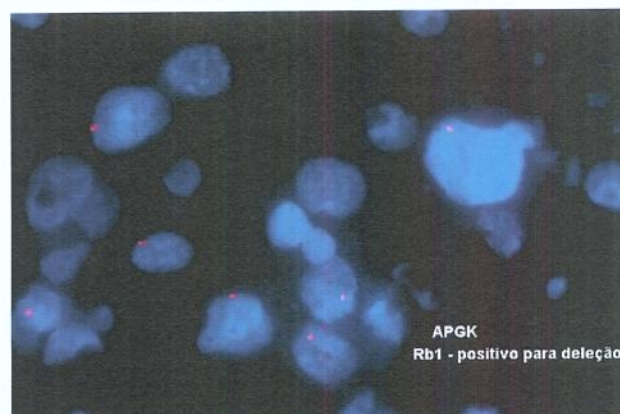
Caso 3: APGK



Profile



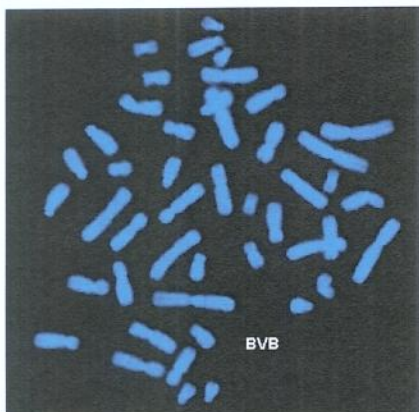
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



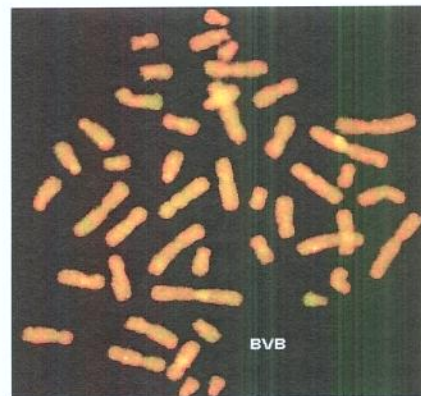
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 4: BVB

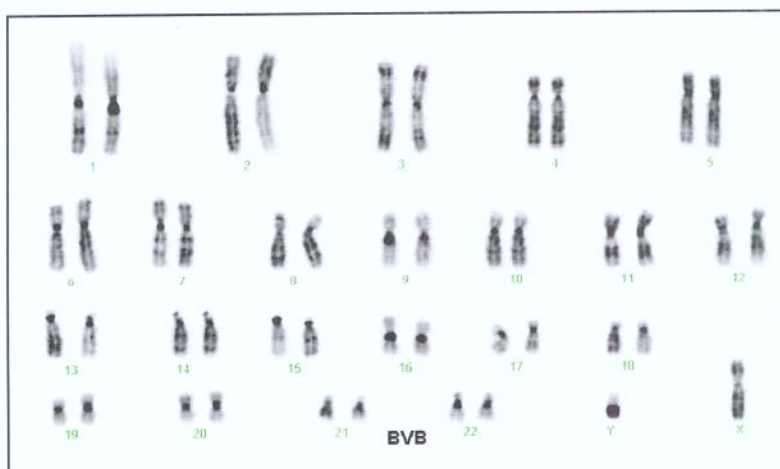
Resultado: +1q31,+2p23,+2q24,+3q23,+4p14~q13,+5q21~q34,+8q13,+8q23,+11q23~qter,
+13q21~q32,-16p12~p13.1,+16q12.2~q13,+18q12~q22,-21q11.2~q21



Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



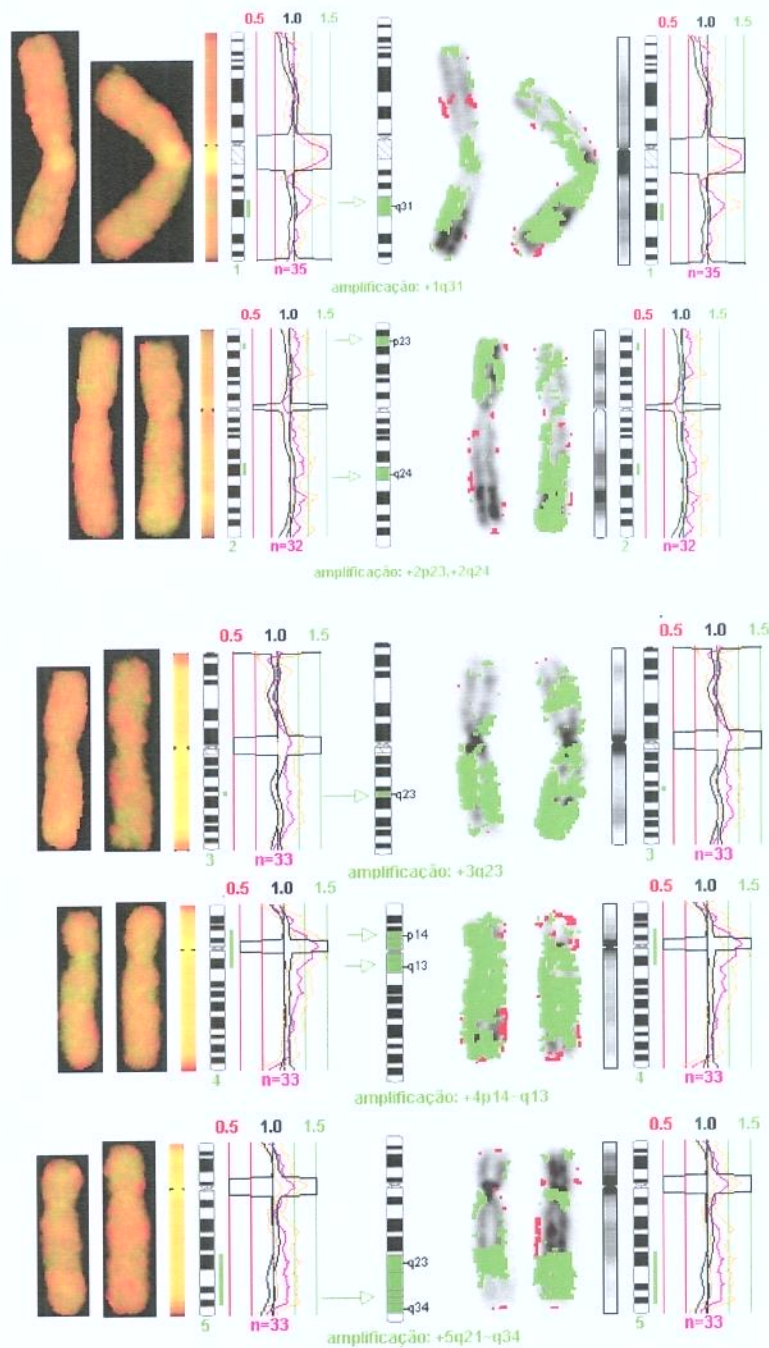
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

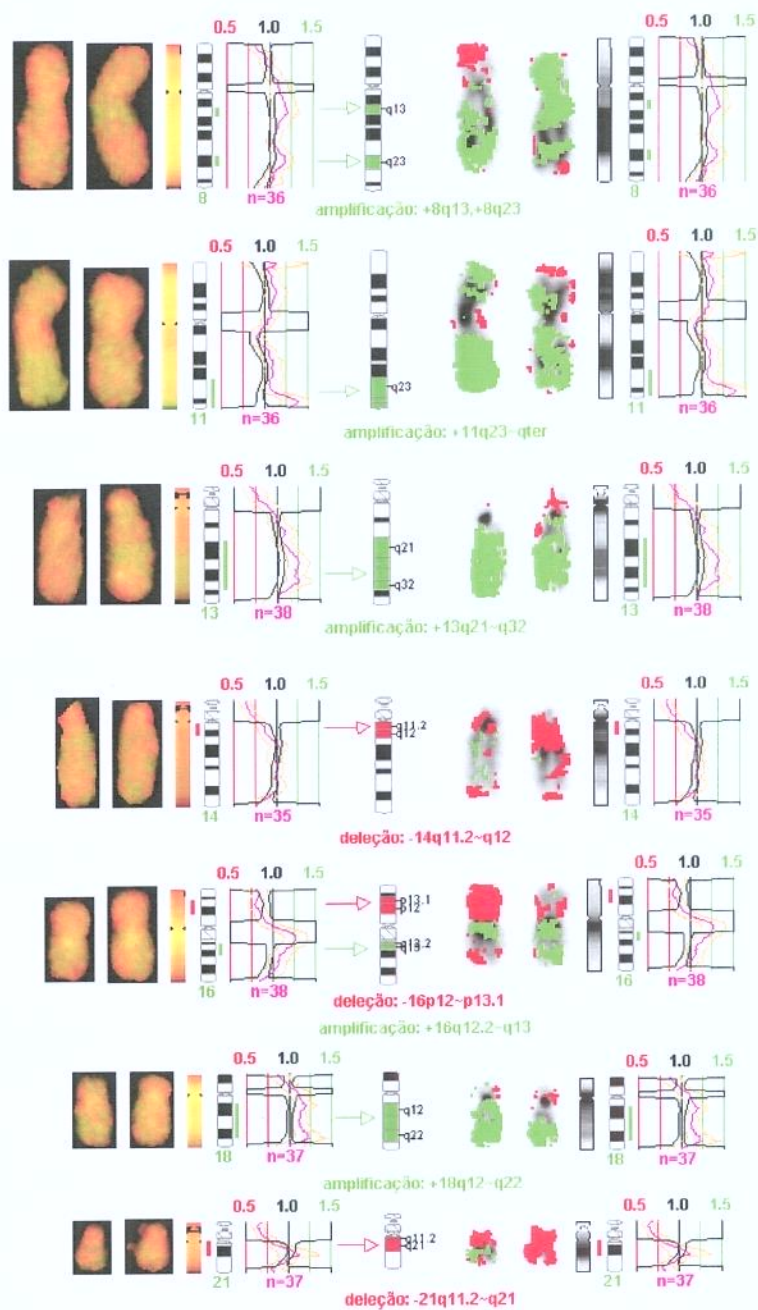
Caso 4: BVB

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

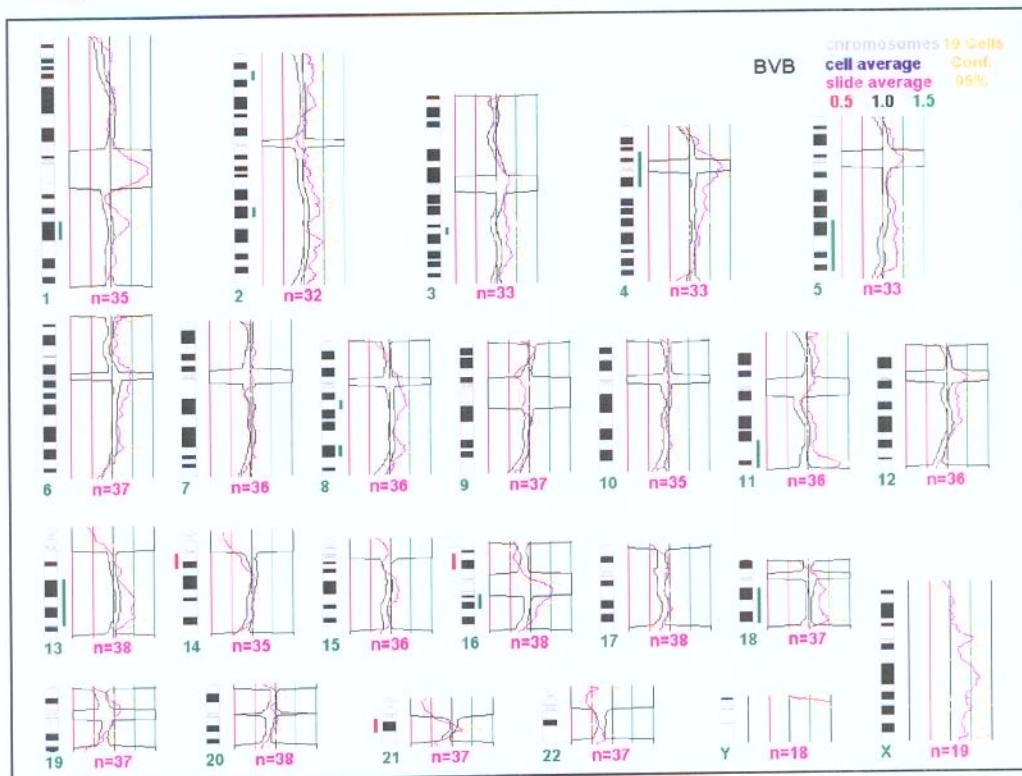


Caso 4: BVB

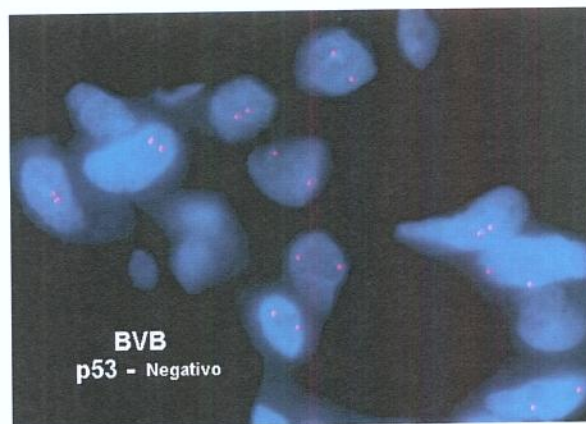
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



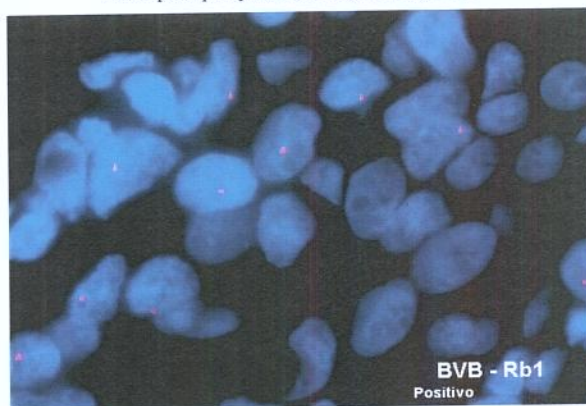
Caso 4: BVB



Profile



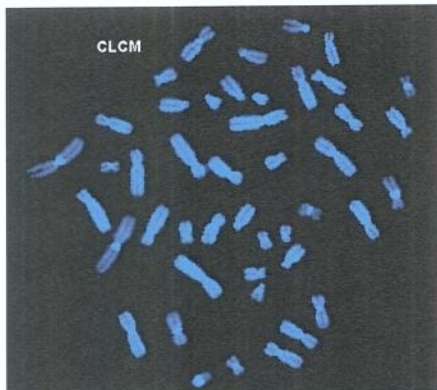
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 5: CLCM

Resultado: +1p32~p33,+1q25~q31,+2q24~q35,+ 5p15.3,+6p21.1,+7p15~pter,+8q24.1~qter,
+9q34,+11q23~qter, +13q33~qter, -14q11.2~q13, -16p11.2~q13.1, -21p11.2~q21



Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



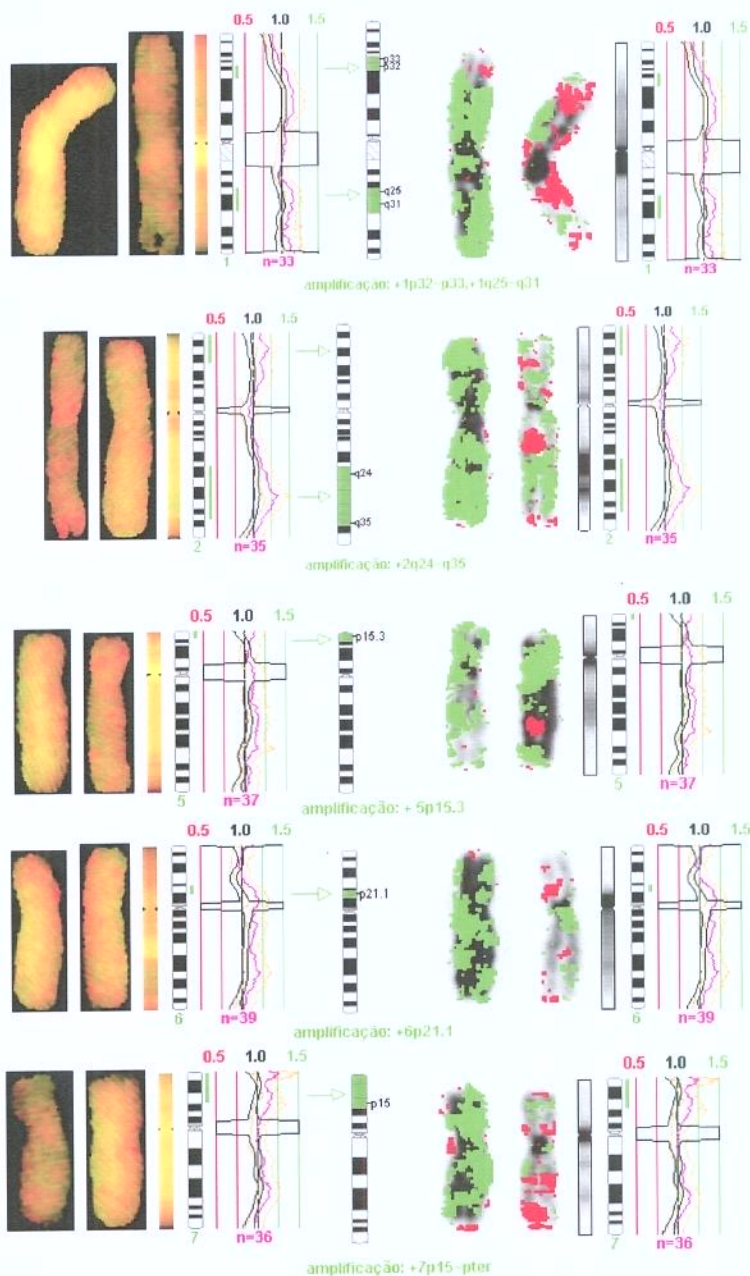
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

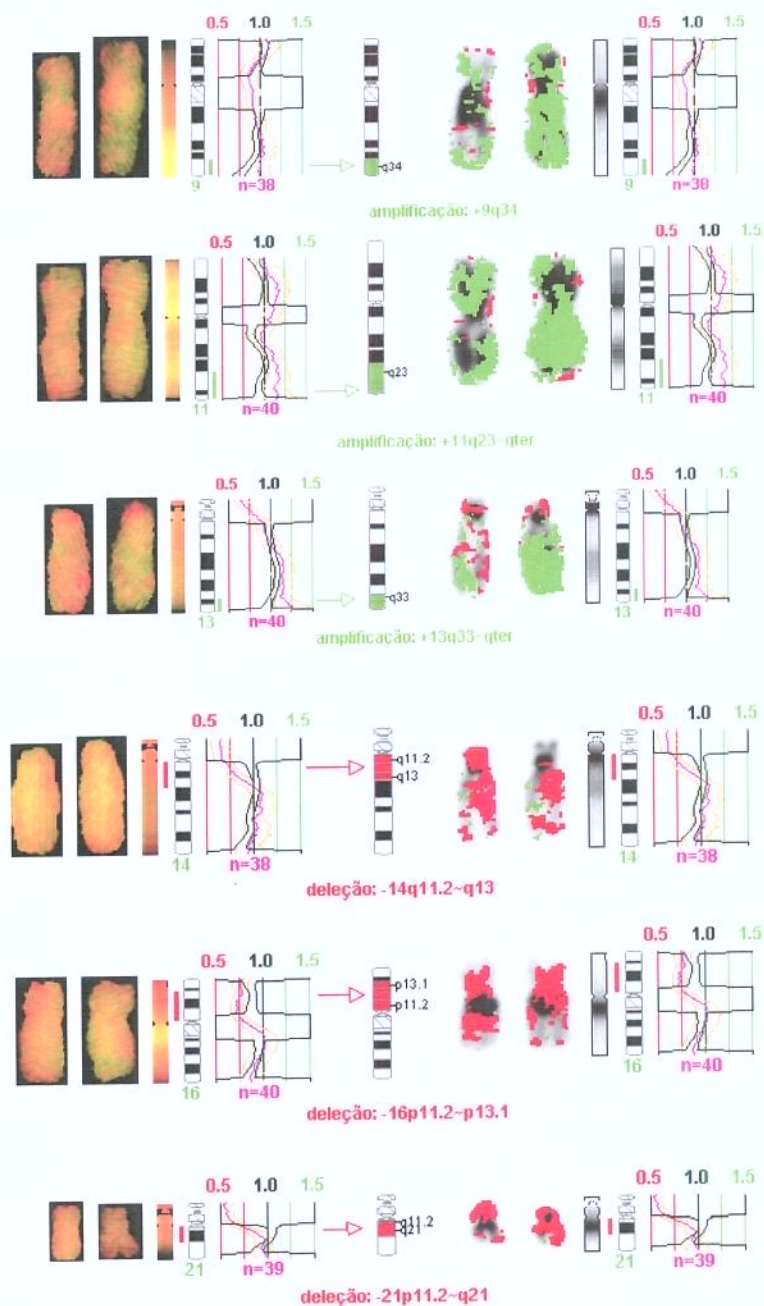
Caso 5: CLCM

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

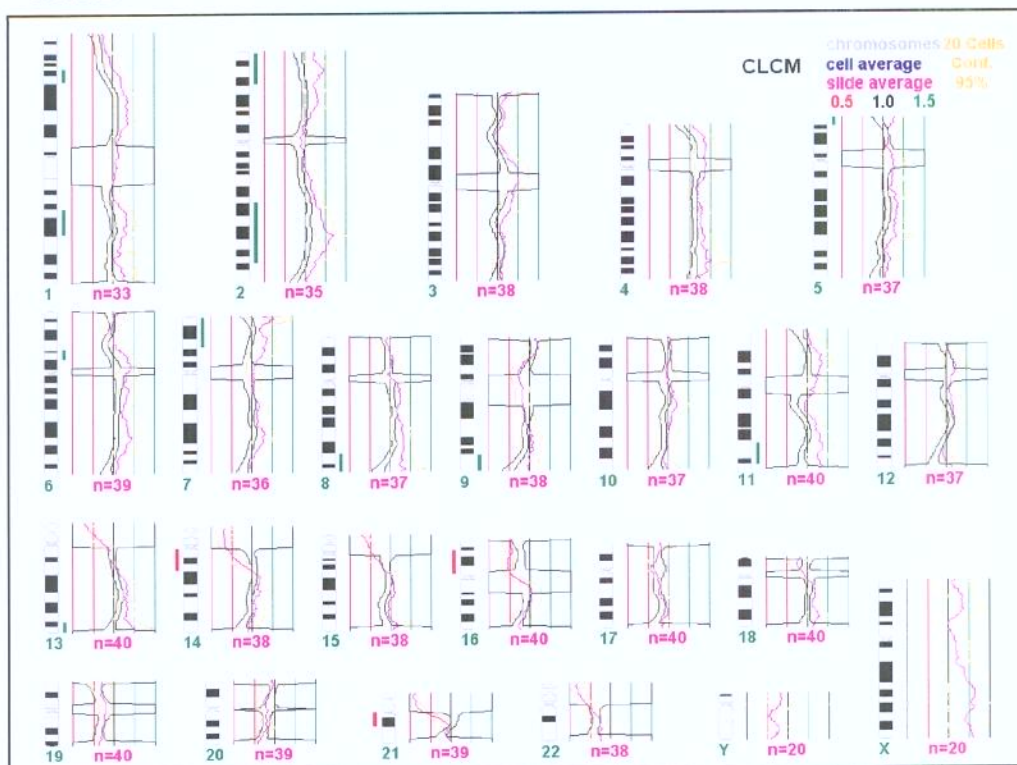


Caso 5: CLCM

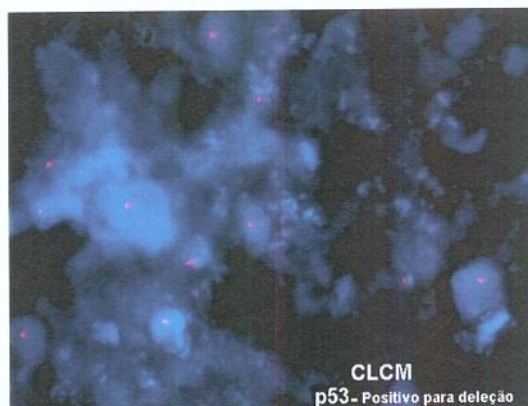
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



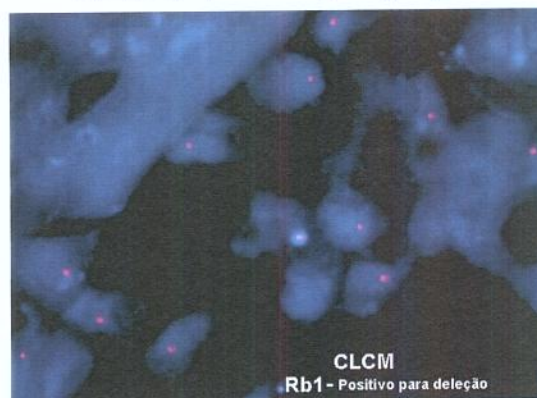
Caso 5: CLCM



Profile



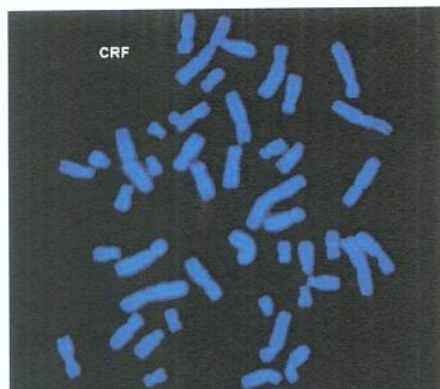
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



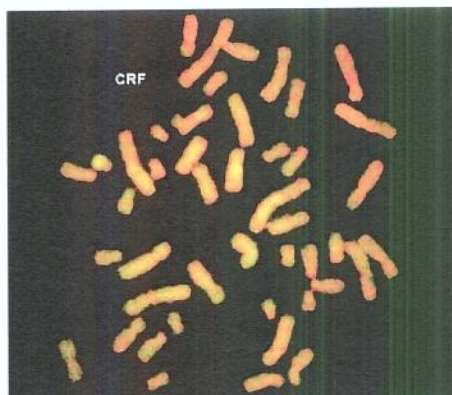
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 6: CRF

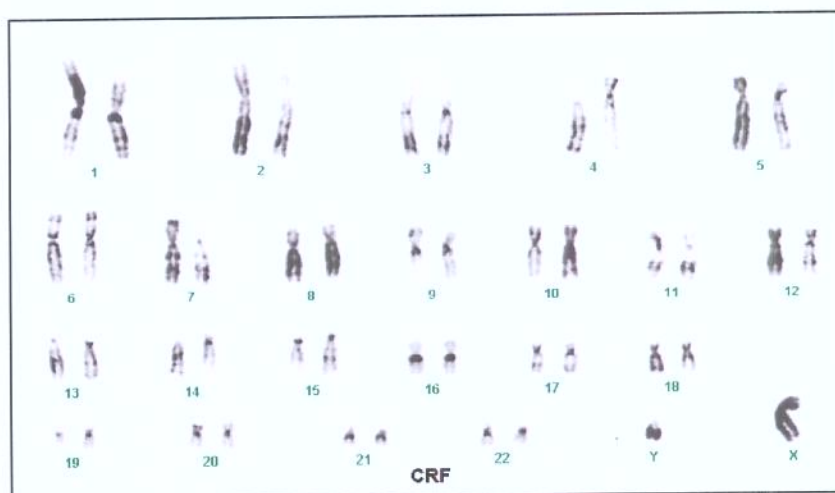
Resultado: +6q14~q16,+6q23~q24,+11p15,-14q11.2,-15q11.2~q15,-16p11.2~p13.1



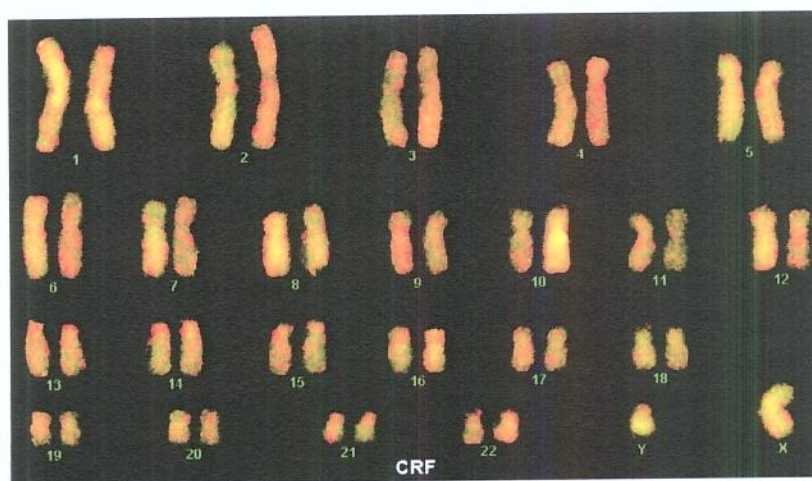
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



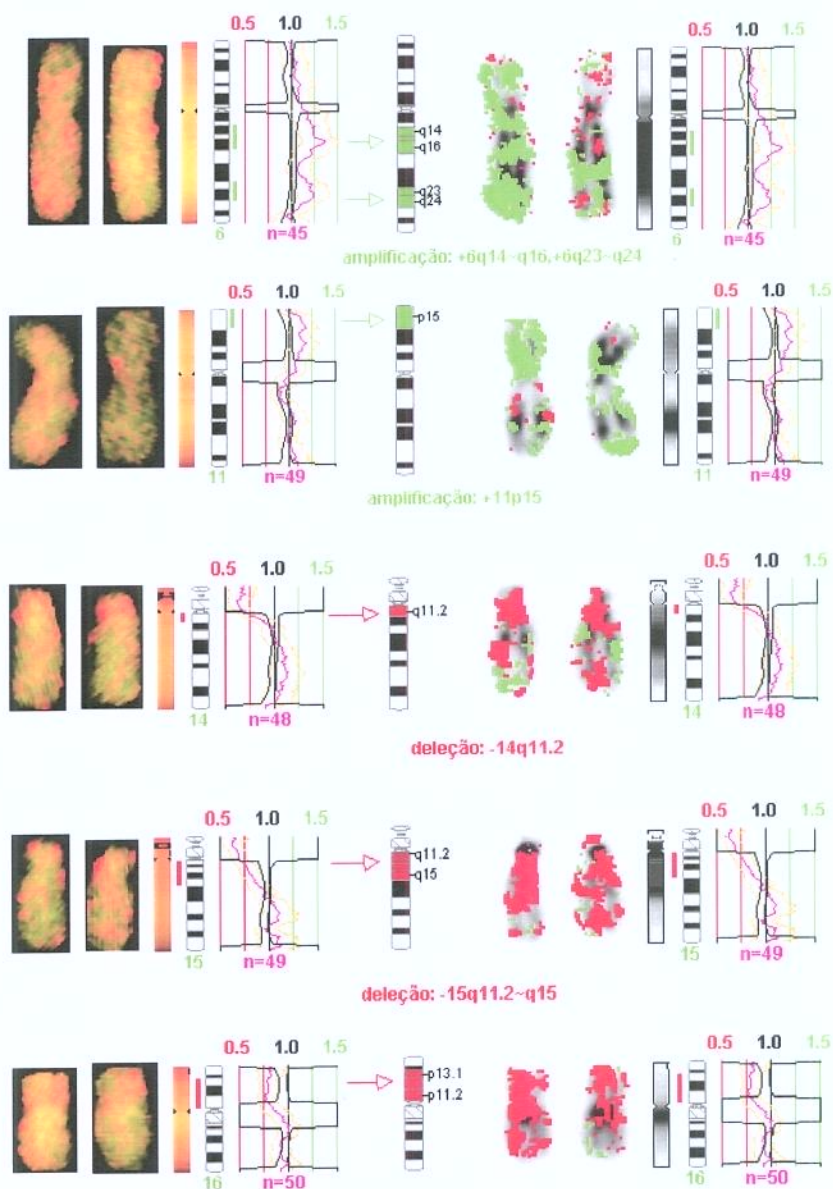
Cariótipo DAPI invertido



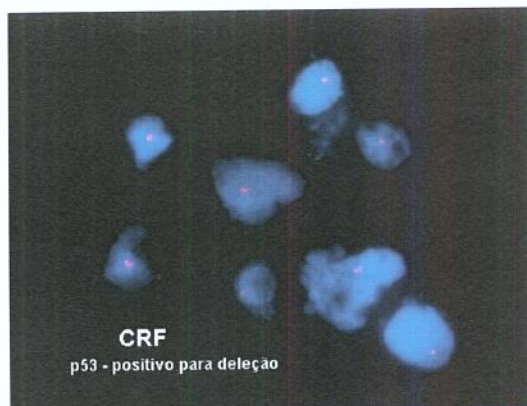
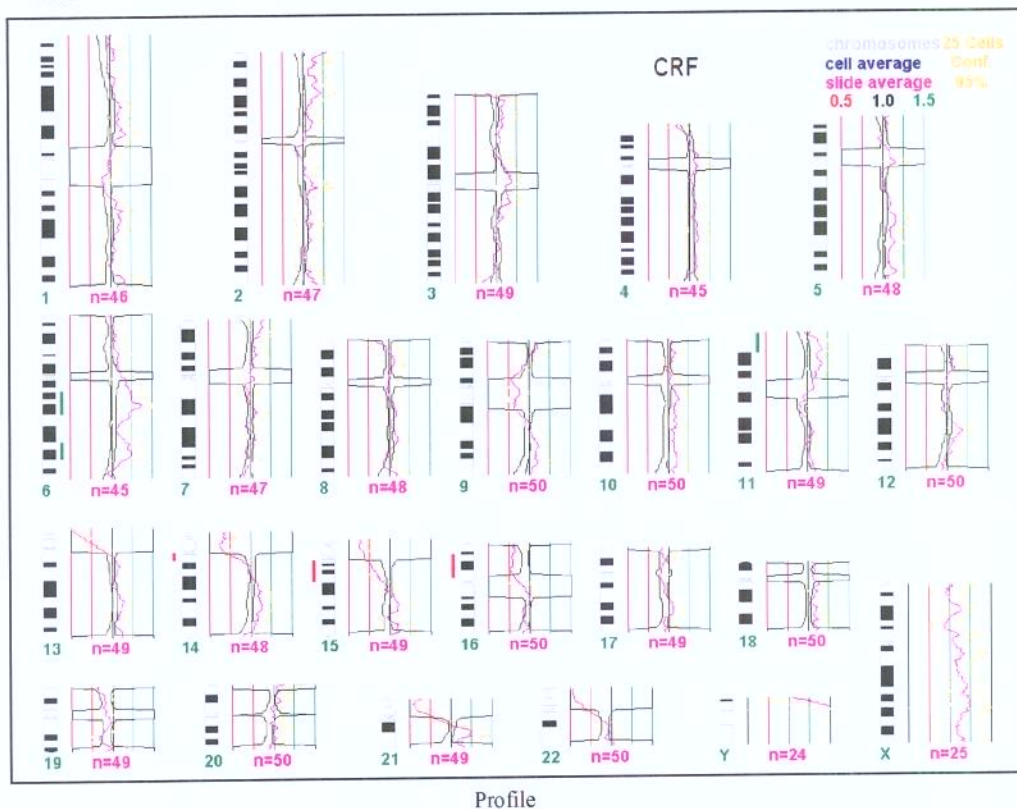
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Caso 6: CRF

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 6: CRF



FISH para pesquisa da deleção do gene p53



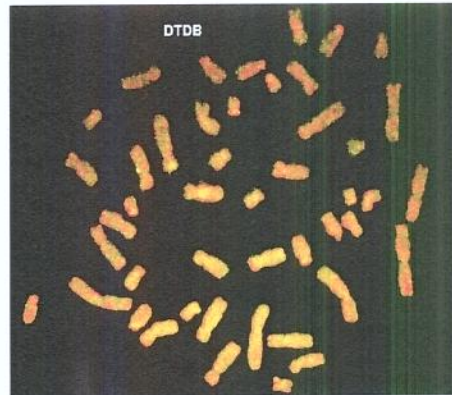
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 7: DTDB

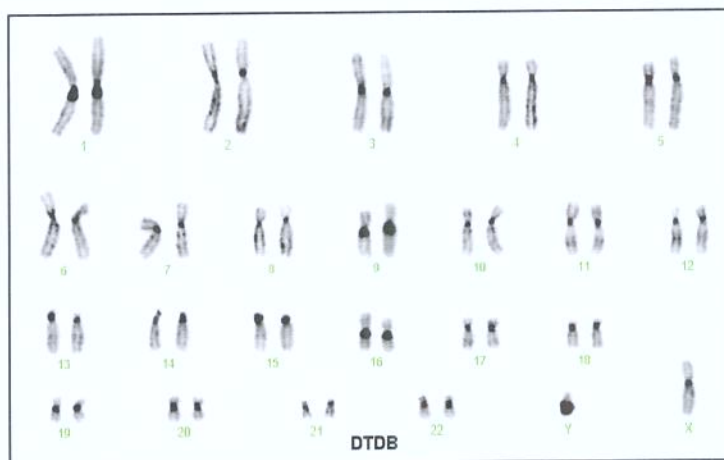
Resultado: +2p23~pter,+3q12~q13.1,+8q24.2~qter,-9q13~q21,+10q25~qter,+12q24.3,-14q11.2~q13,-16p12,+17q24~qter,-21q11.2~q21



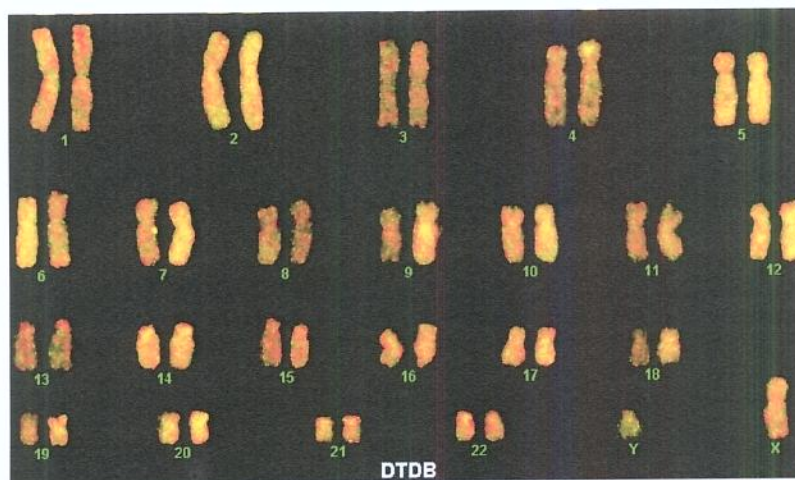
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



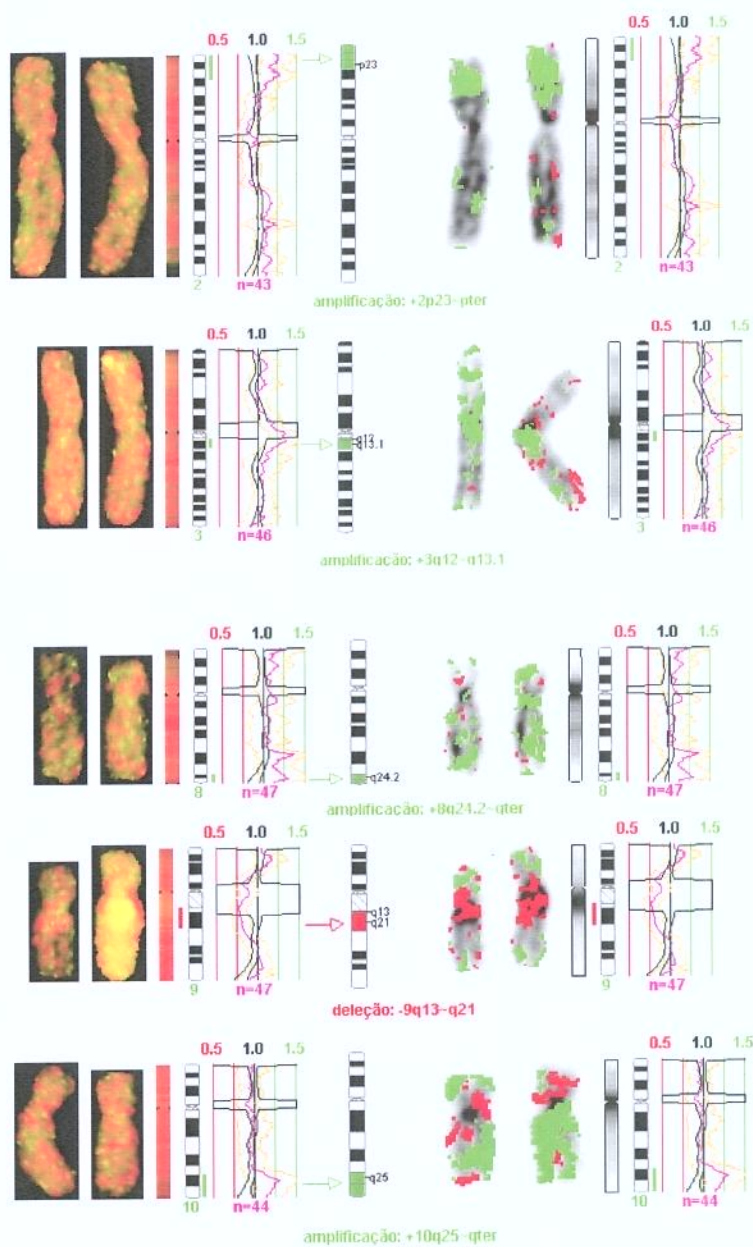
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

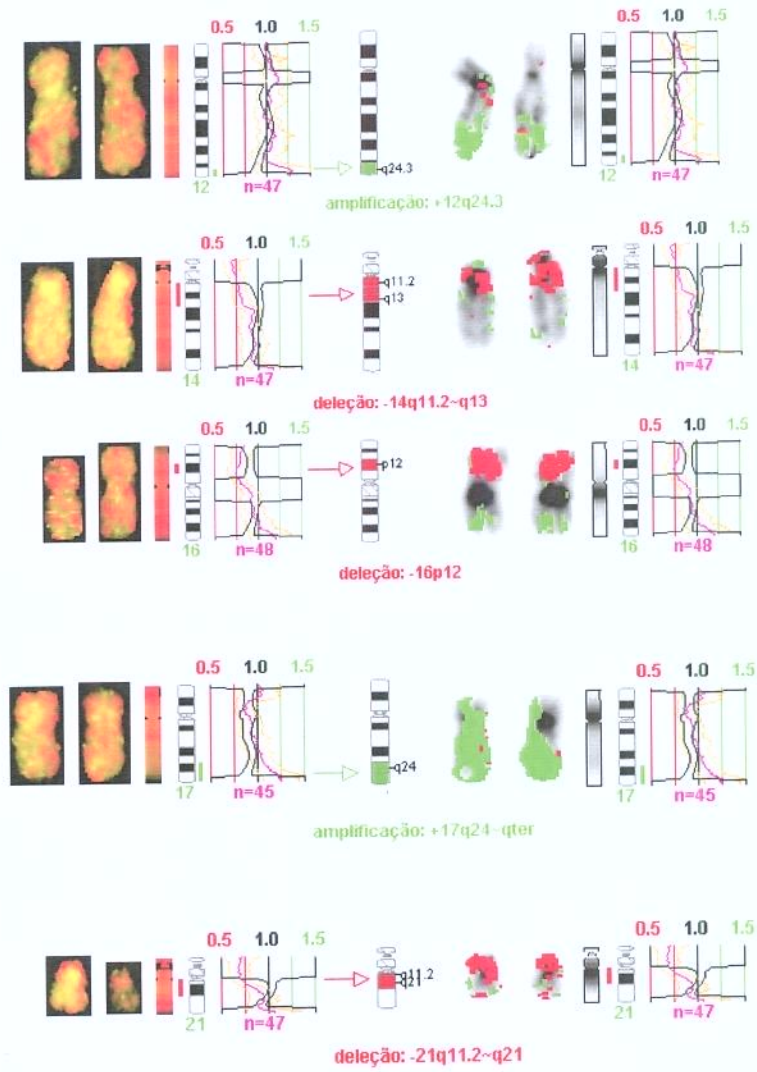
Caso 7: DTDB

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

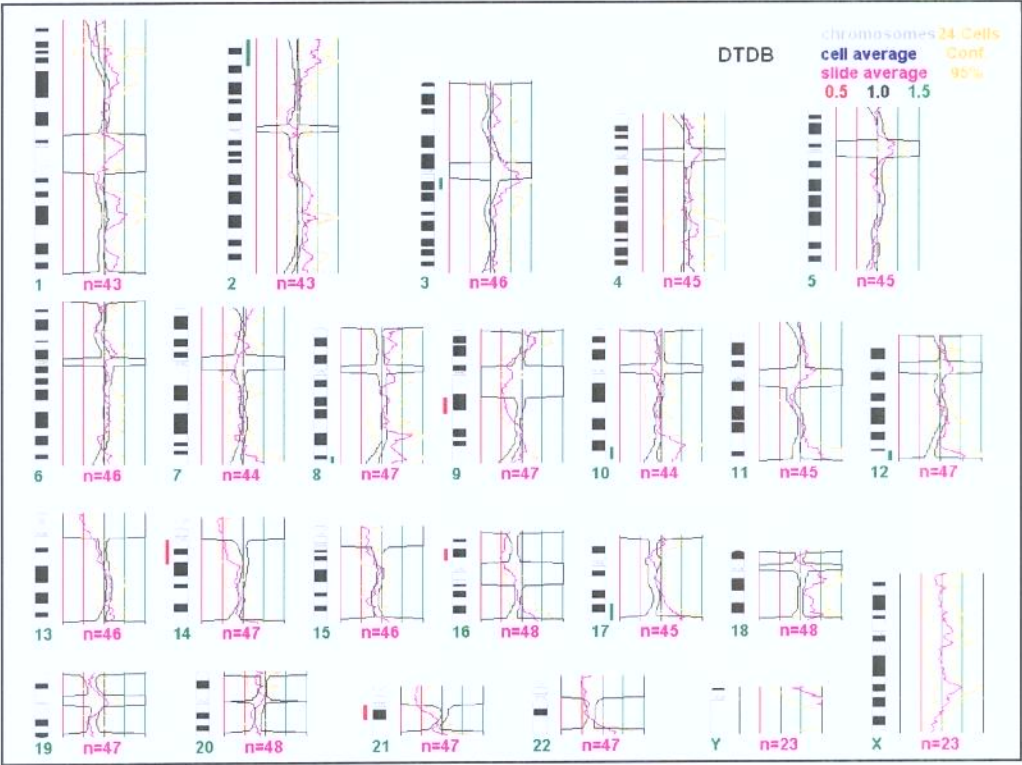


Caso 7: DTDB

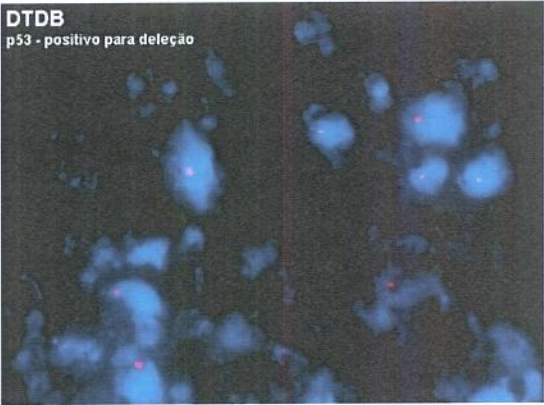
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



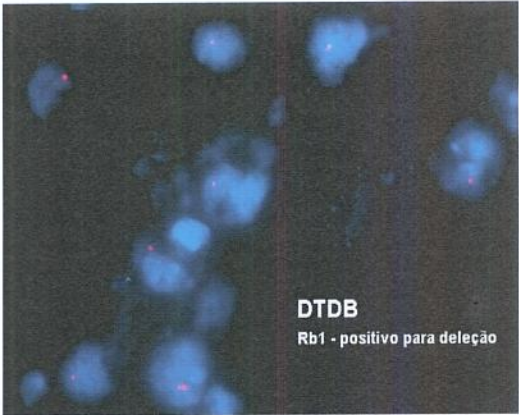
Caso 7: DTDB



Profile



FISH para pesquisa da deleção do gene p53



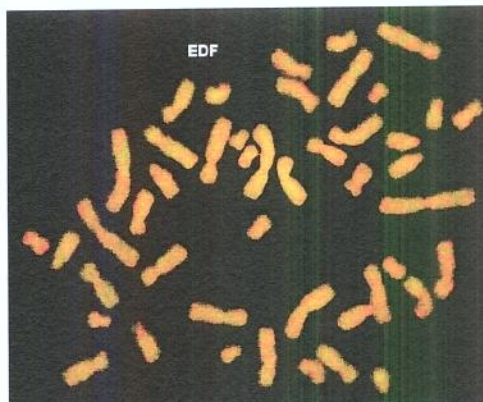
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 8: EDF

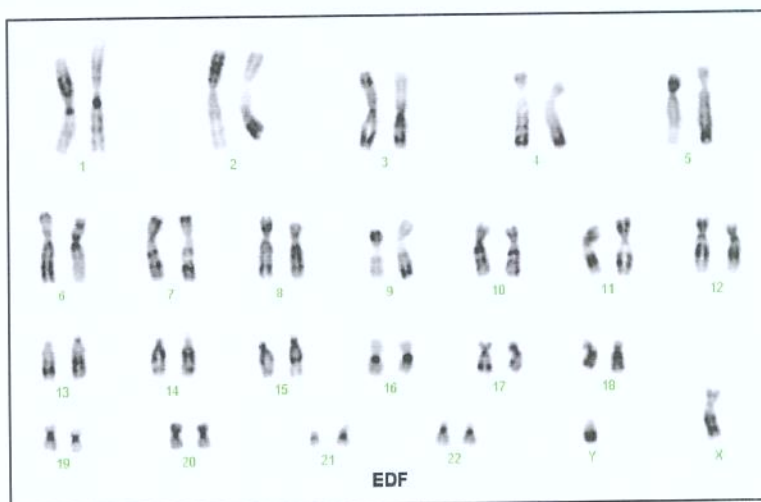
Resultado: +1p13~pter,+1q23~q25,+2q37,+4q24,+11q24~qter,-17q23



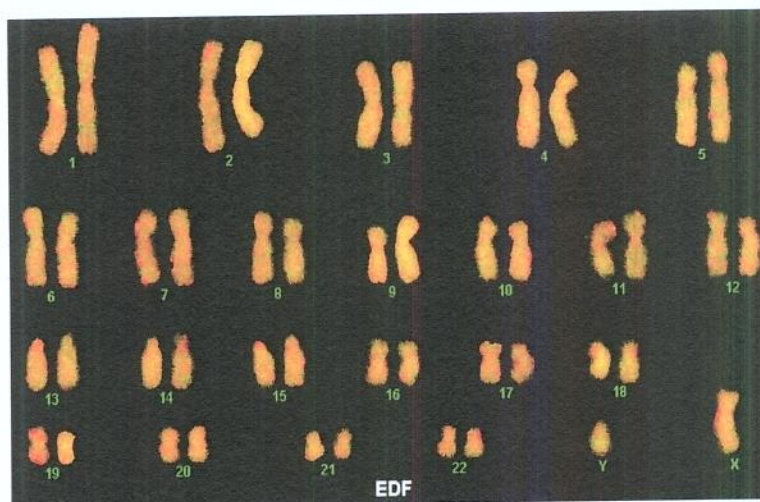
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



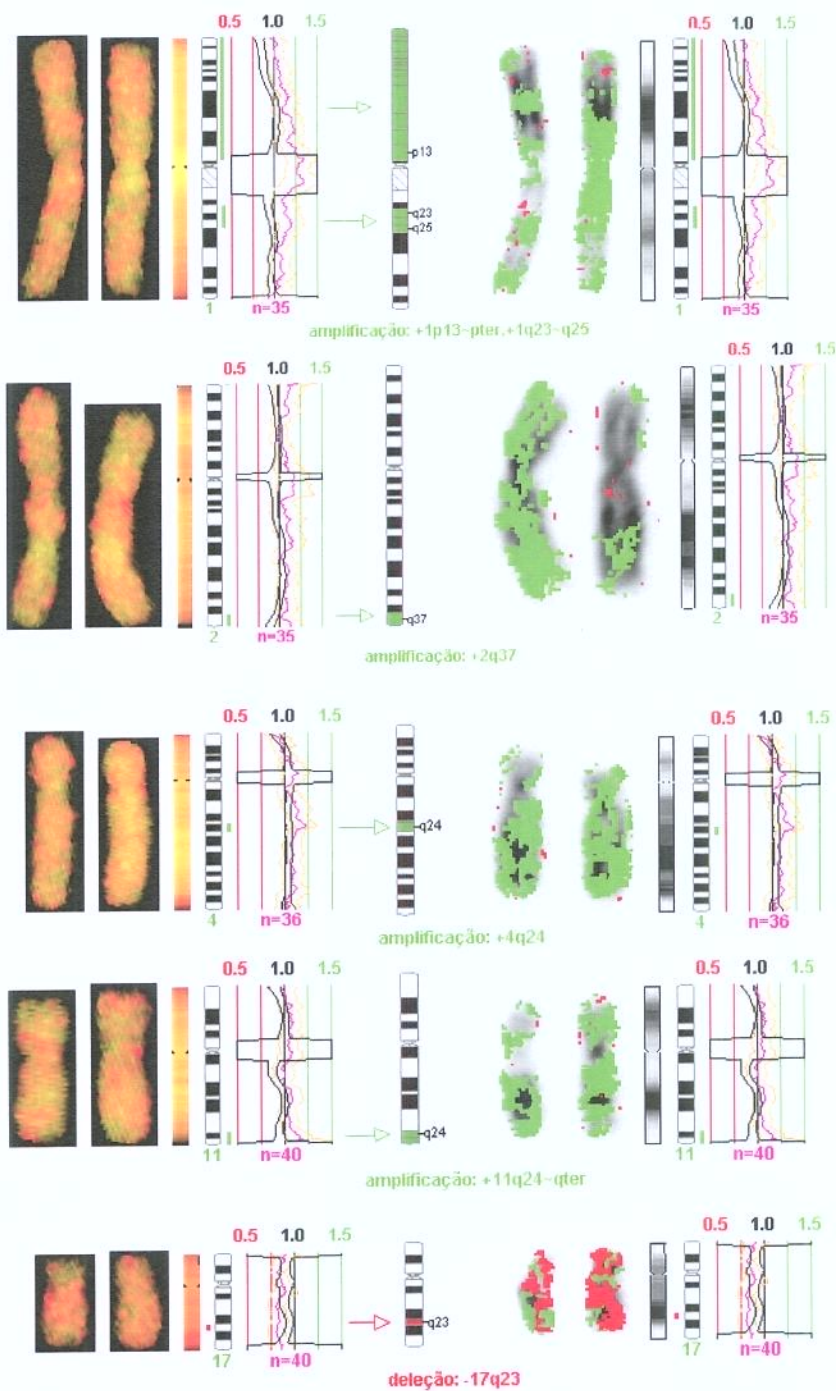
Cariótipo DAPI invertido



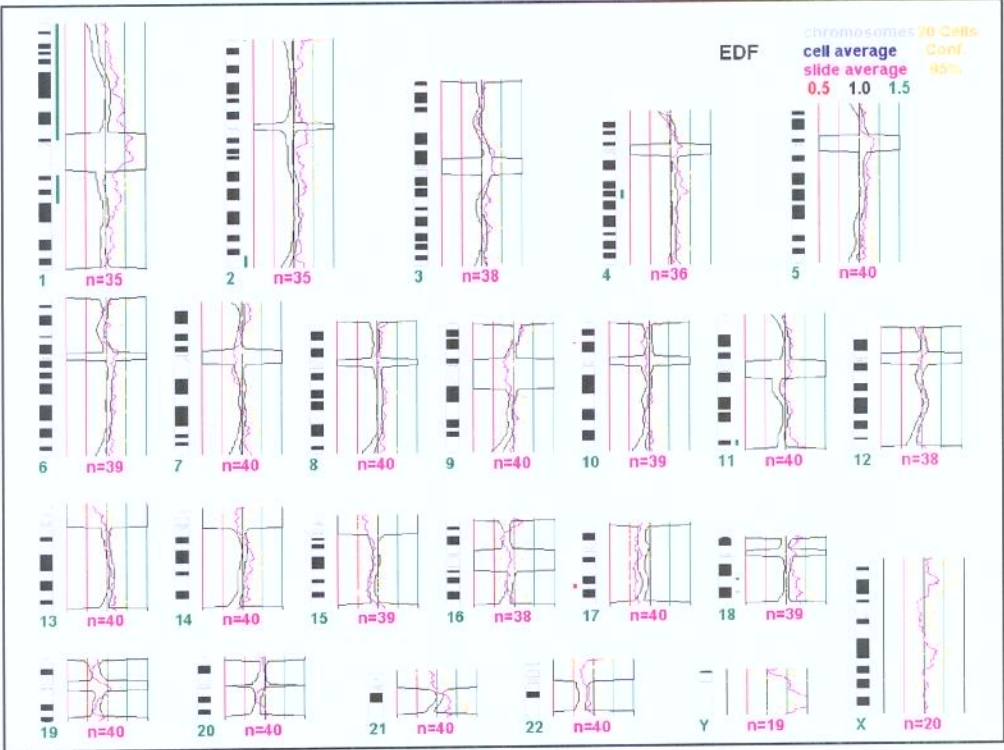
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Caso 8: EDF

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 8: EDF



Profile



FISH para pesquisa da deleção do gene p53

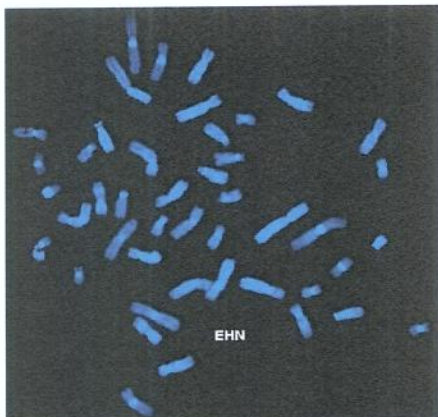


FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 9: EHN

Resultado:

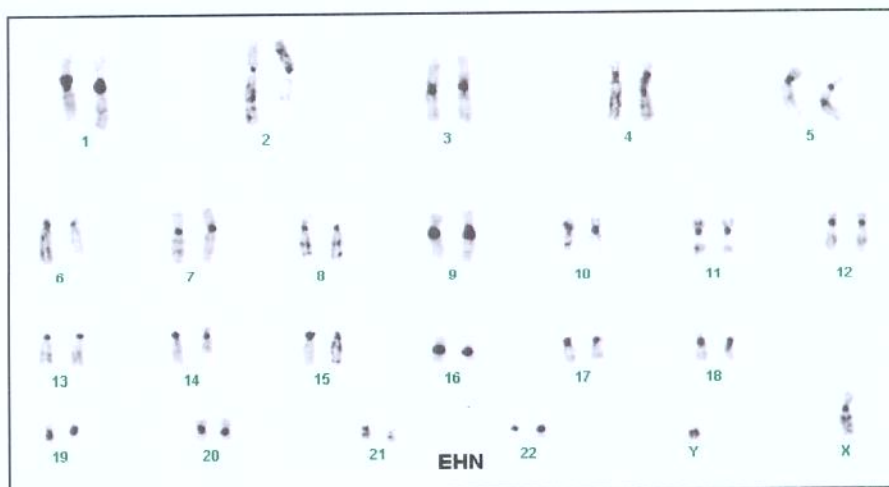
+1,+2,+3,+4p13~p15.3,+4q,+5p13~pter,+5q,+6p12~p21.1,+6p22~p25,+6q,+7p13~pter,+7q,+8,+9p21~pter,+9q21~q32,10p12~pter,+10q,+11p12~pter,+11q,+12p12~p13,+12q12~q23,+13q13~qter,+14q11.2~q31,+15q14~q26,+16q13~q24,+18p11.3,+18q,+20p11.2~p12,+21q



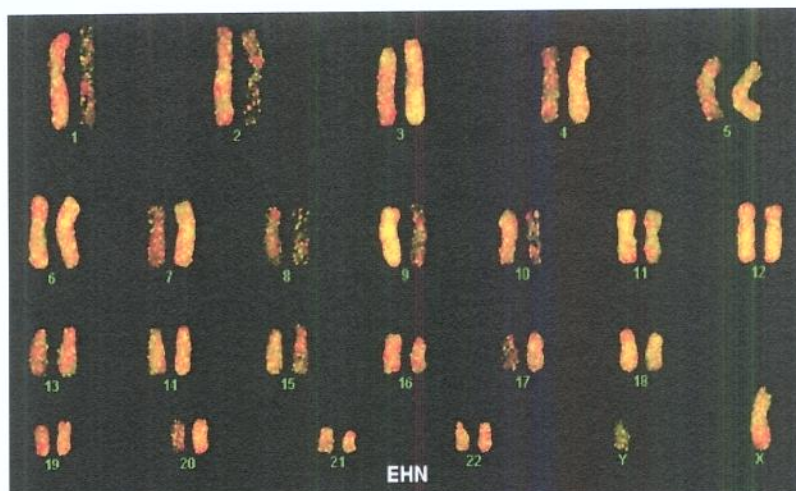
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



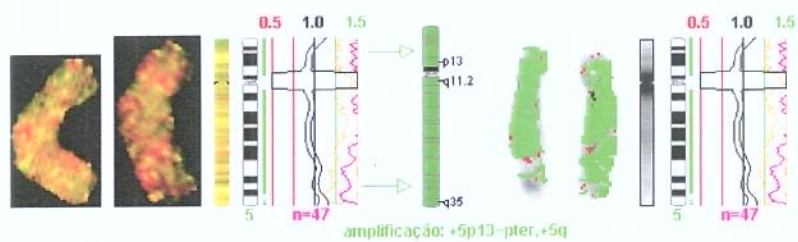
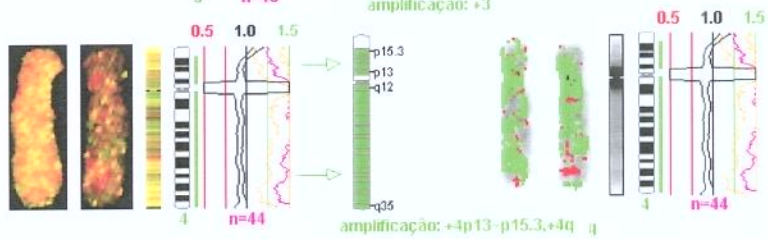
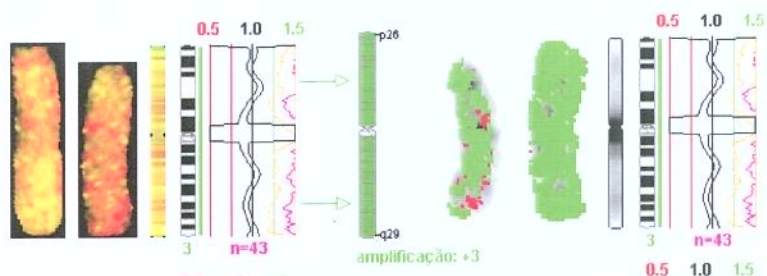
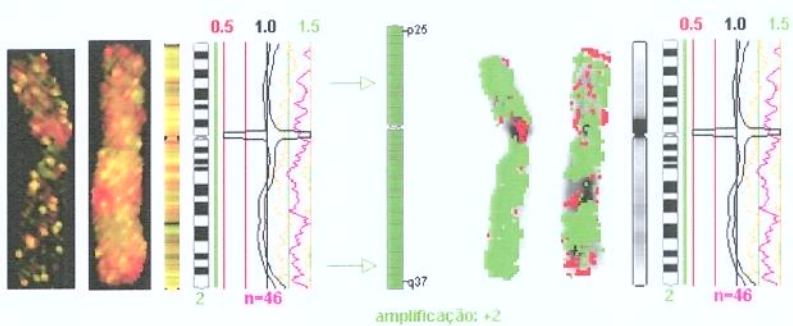
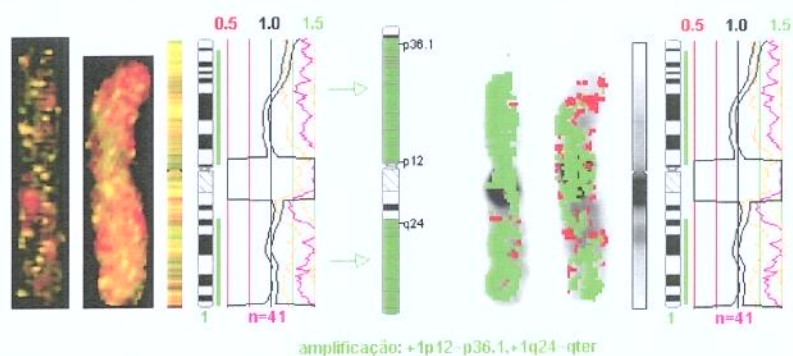
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

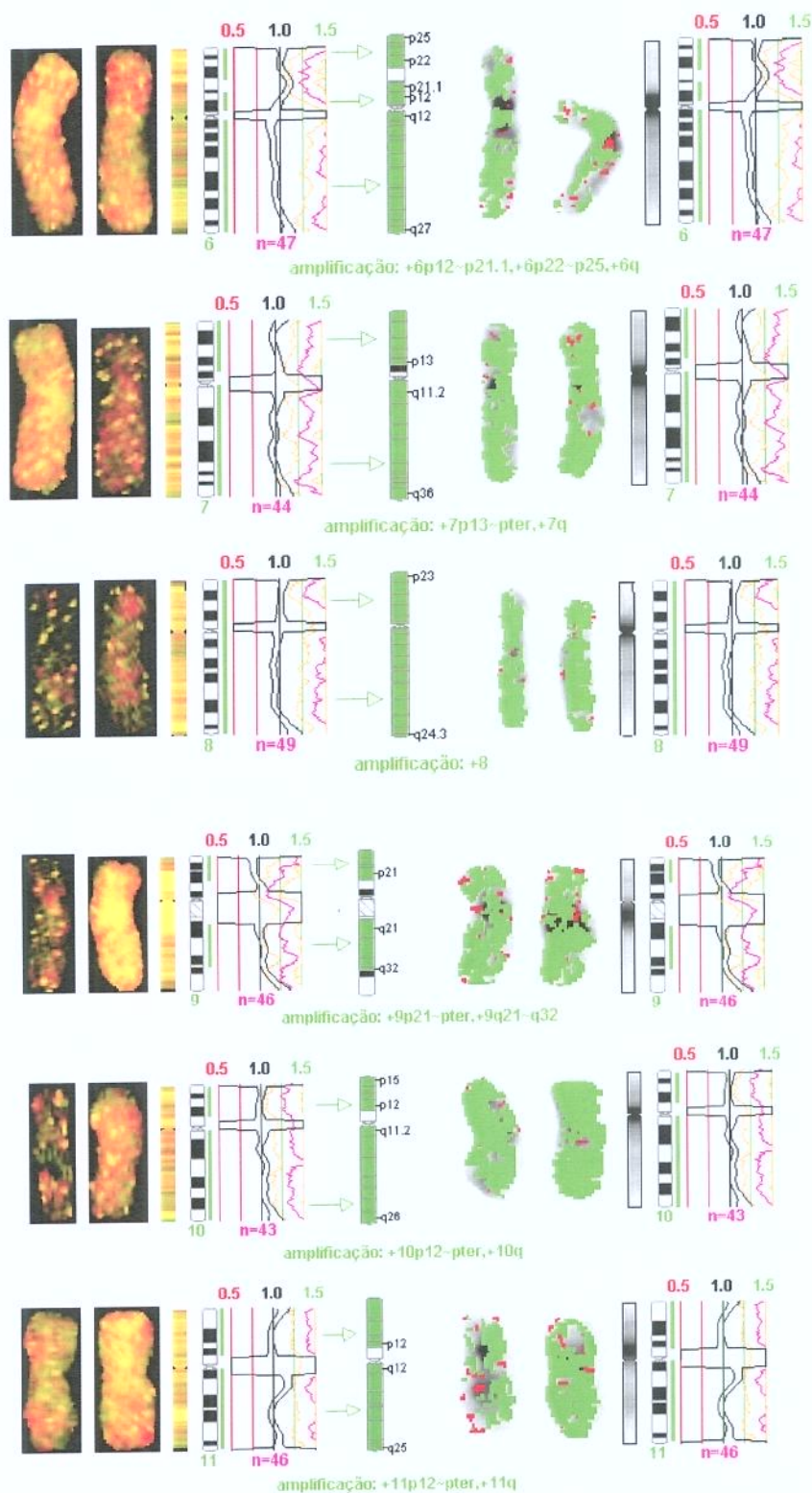
Caso 9: EHN

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



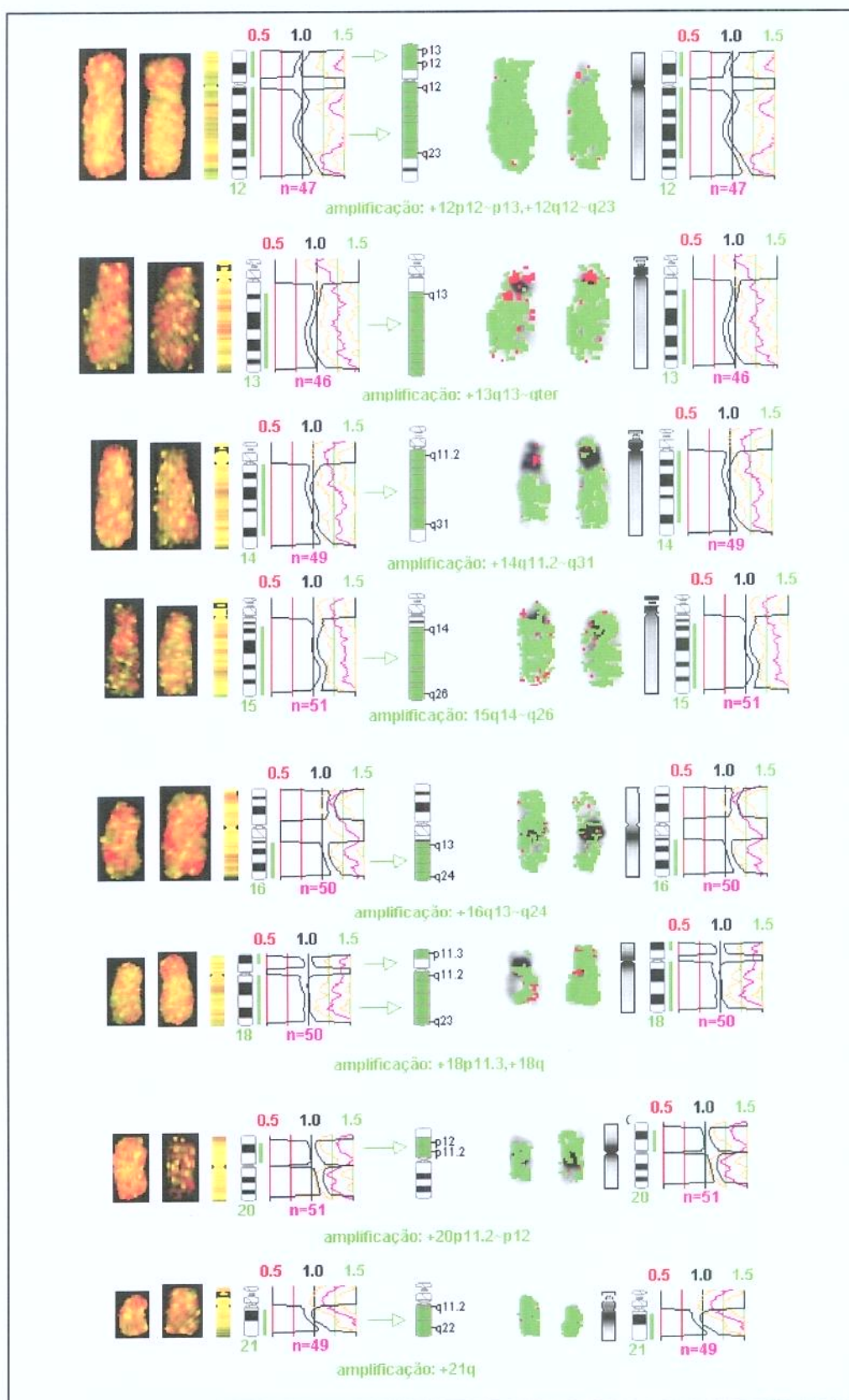
Caso 9: EHN

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

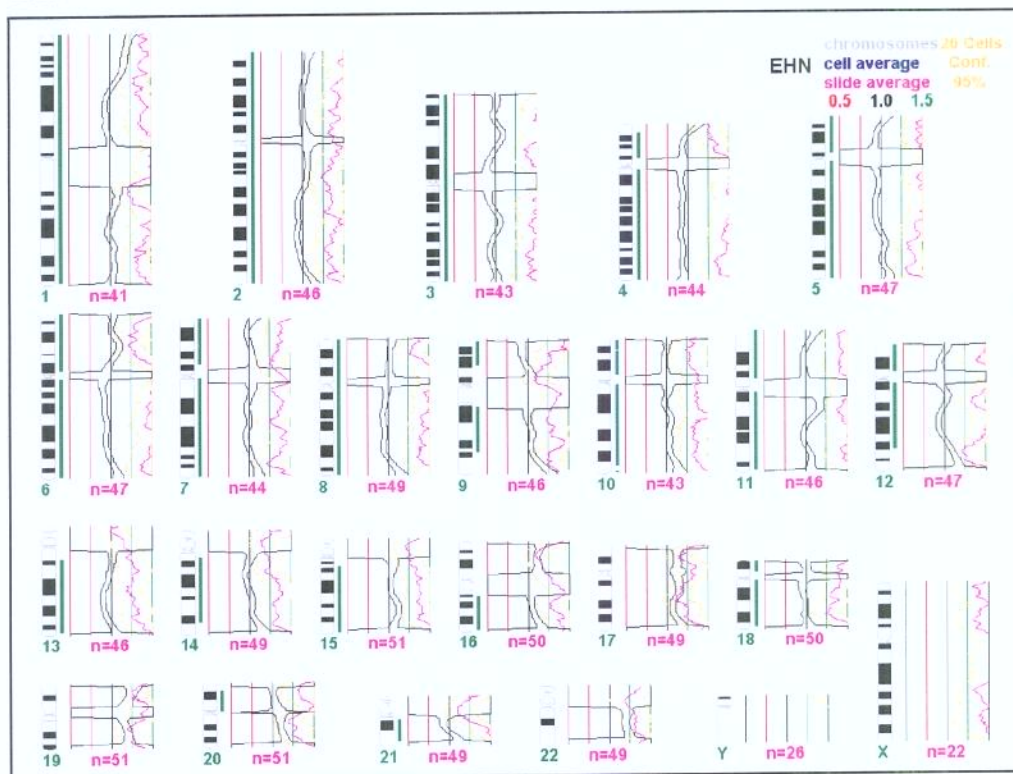


Caso 9: EHN

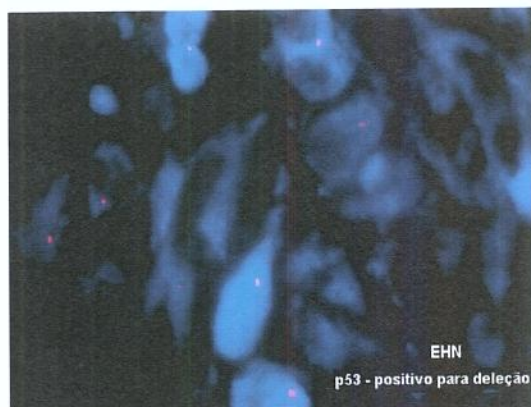
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 9: EHN



Perfil



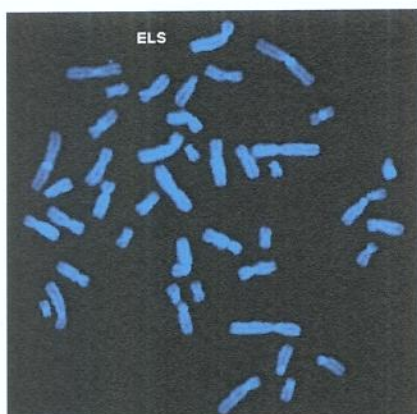
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



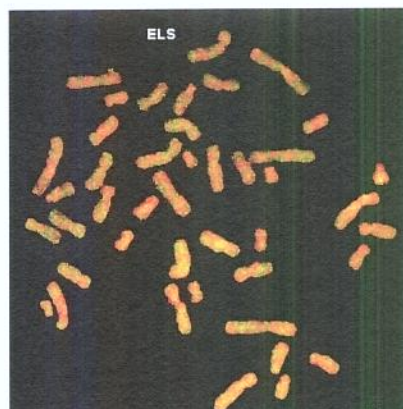
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 10: ELS

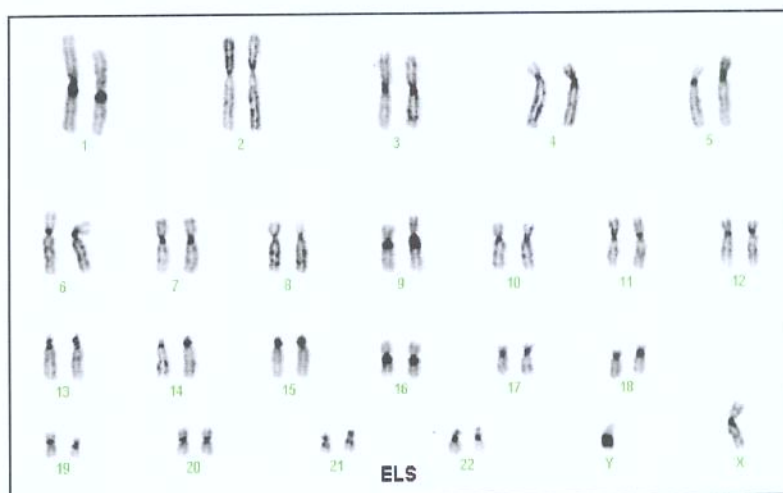
Resultado: +2q31,+2q36~qter,+6q15~q16,+7p14~pter,+7q21~q22,+7q36,+8q11.2~q12,+10q24~q25,+11q22~q23,+13q34,+18q22~q23,-21q11.2



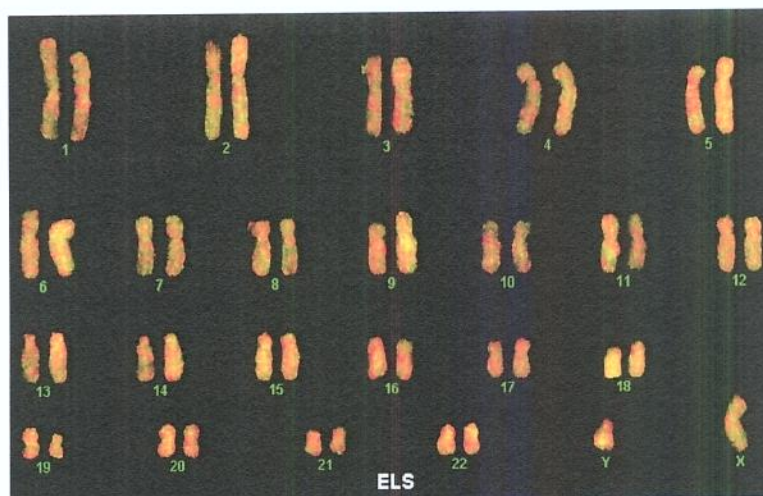
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

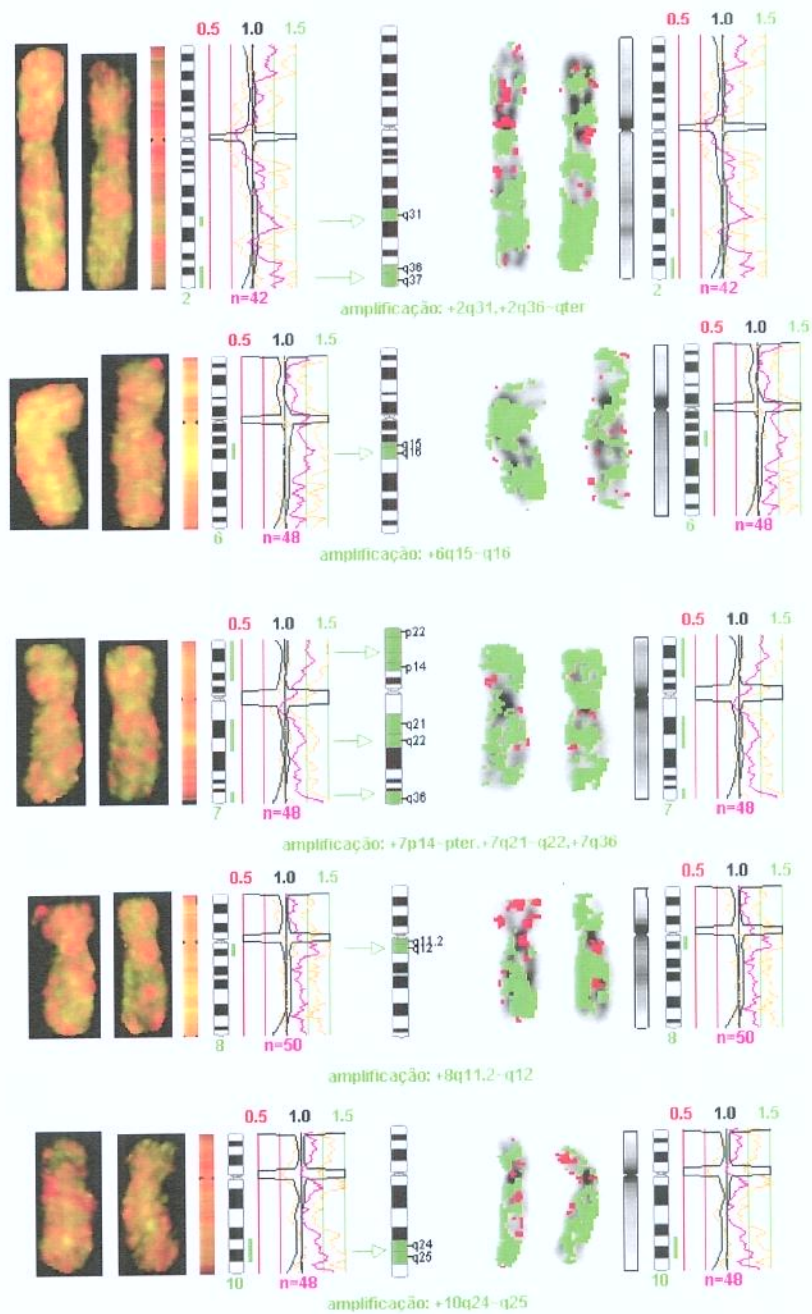


Cariótipo DAPI invertido



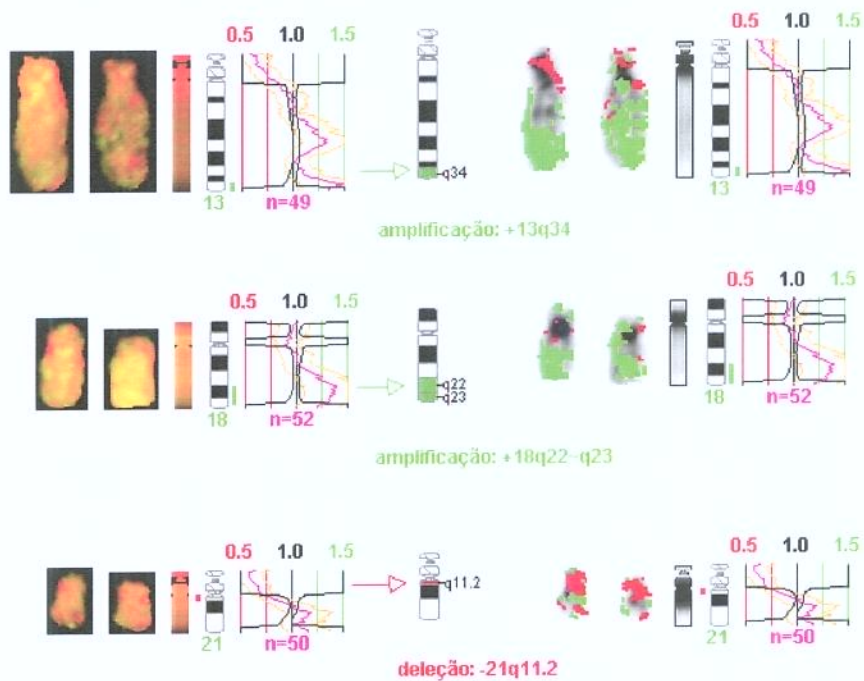
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

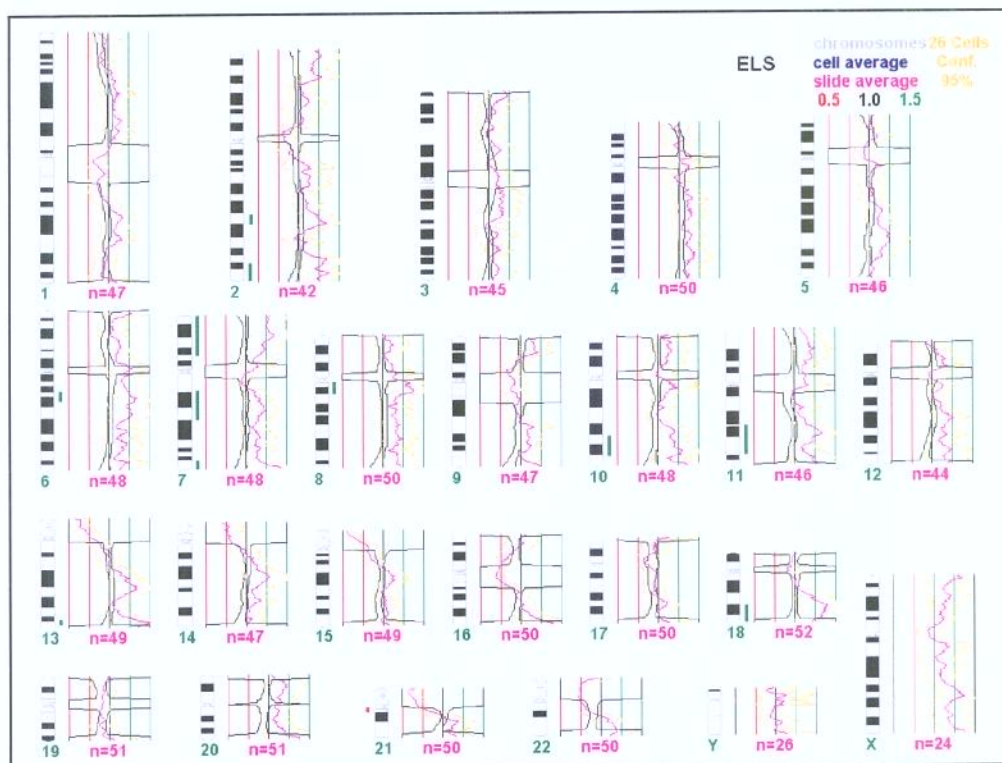


Caso 10: ELS

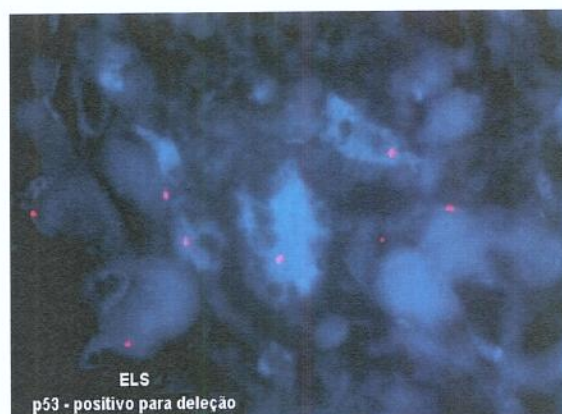
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



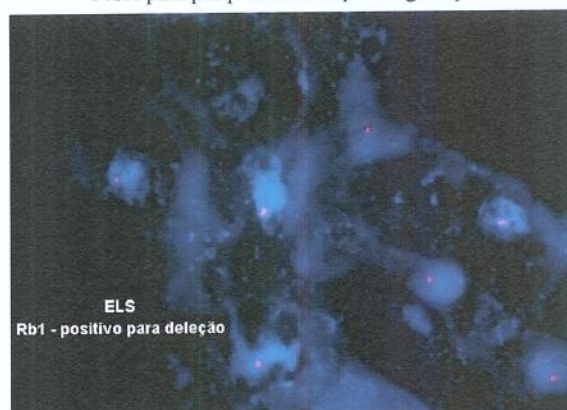
Caso : 10 ELS



Profile



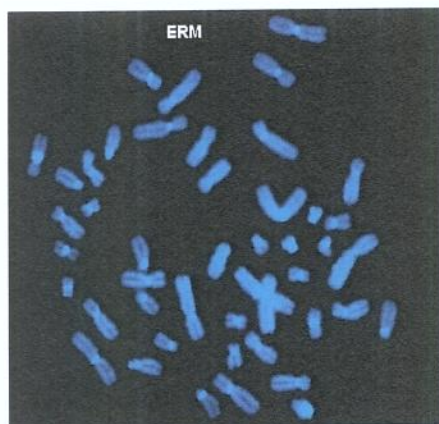
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 11: ERM

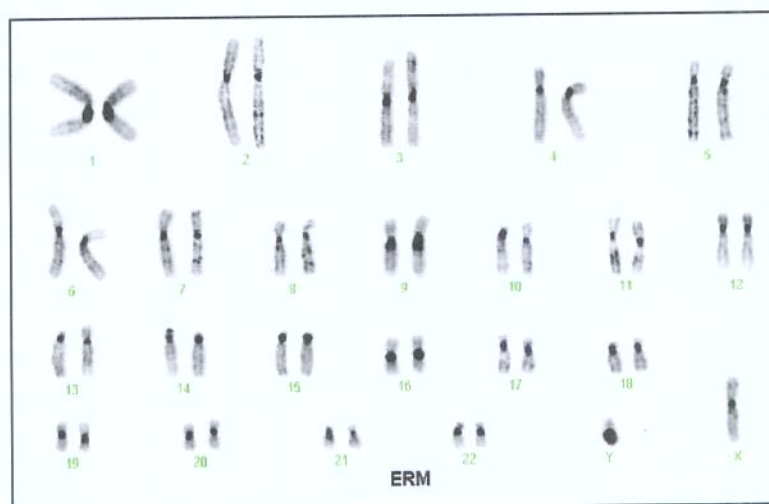
Resultado: +2p23~pter,-9p13,-9q21,-15q11.2~q21,+16q24,+17q25, -21q11.2



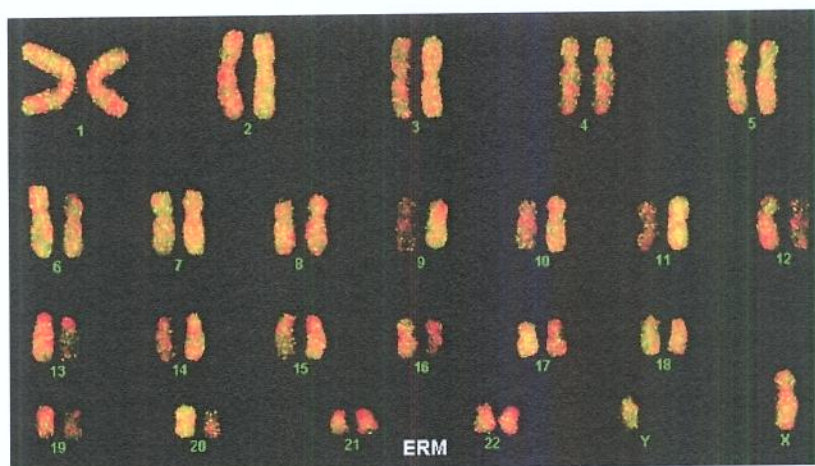
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

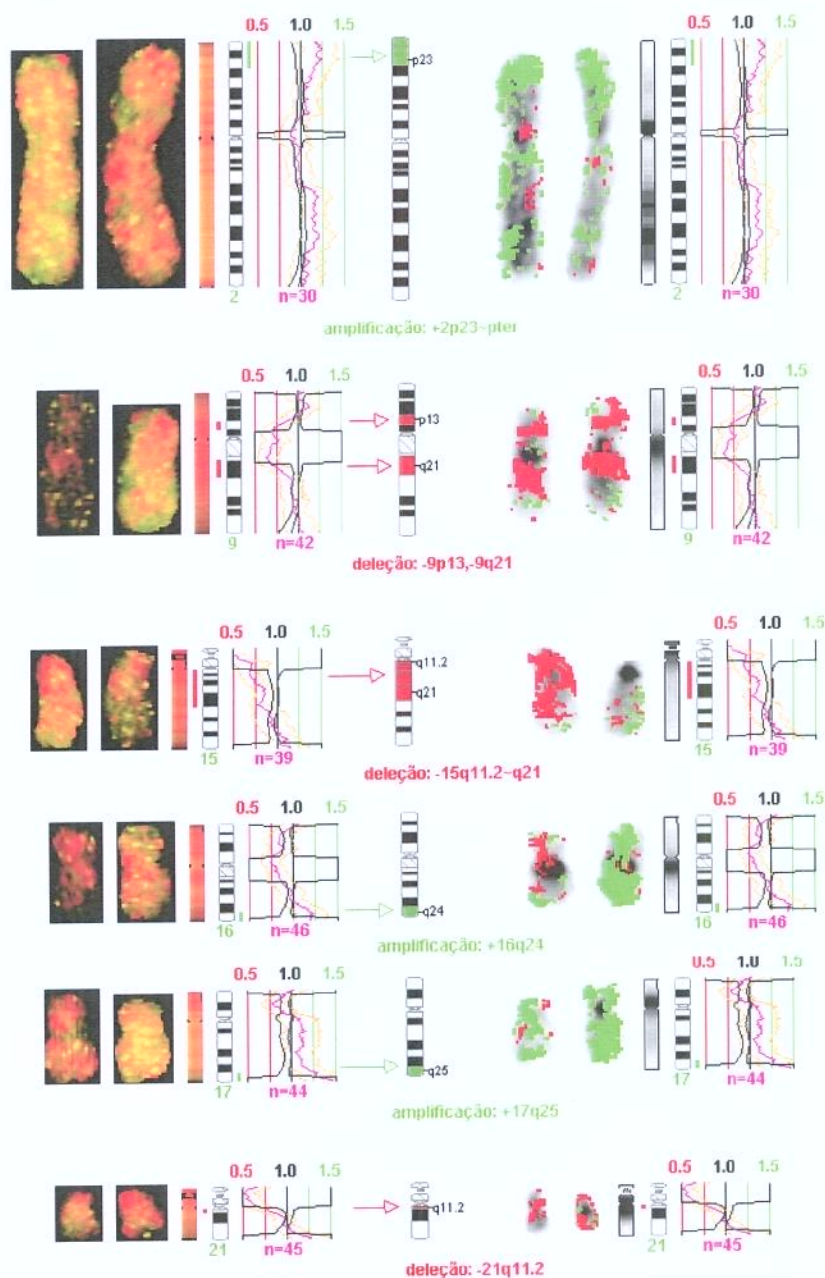


Cariótipo DAPI invertido

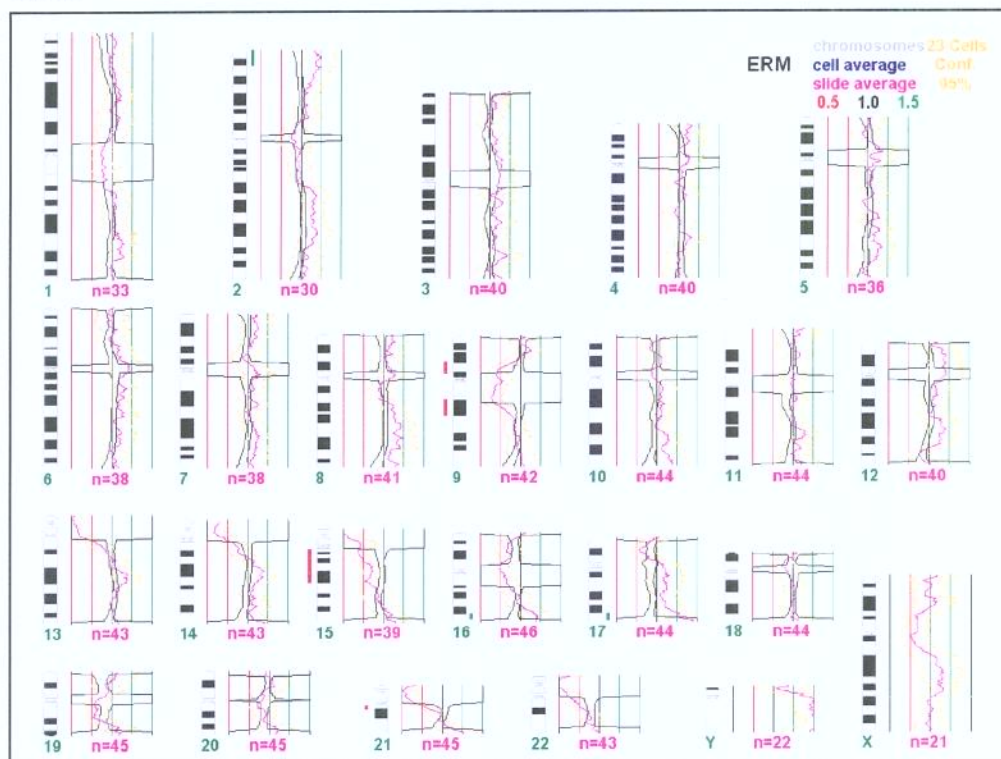


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

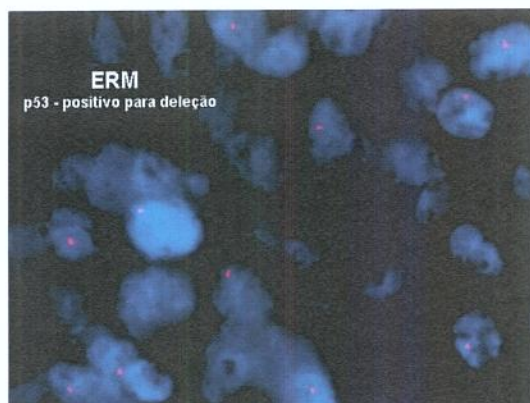
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



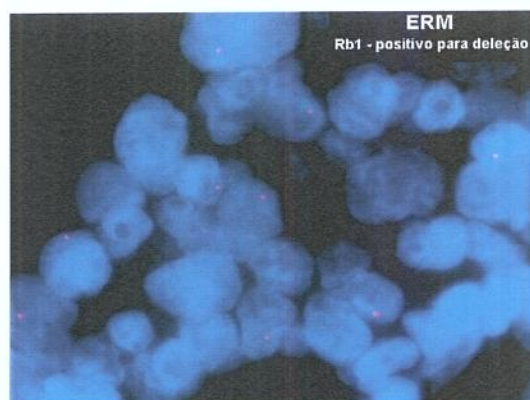
Caso 11: ERM



Profile



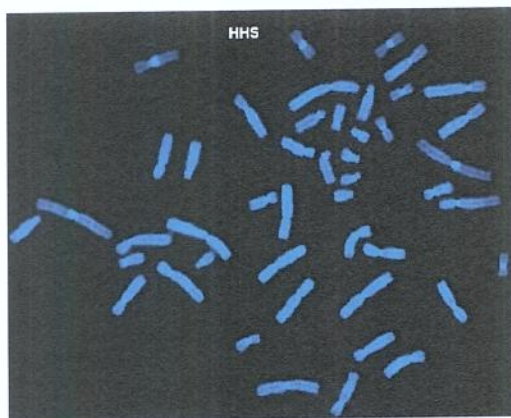
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 12: HHS

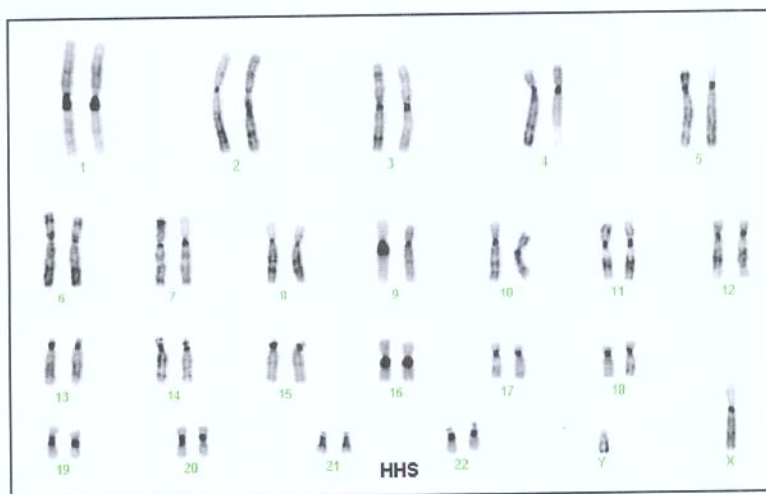
Resultado: +1p24.1~p34.2,+2p23,+2q24,+2q32,-2p11.2~q11.2,+3p21,+5q32~q33,+9q31~qter,+10q23,-14q11.2~q12,-16p13.1,+18q12~q21,-21q11.2~q21,-22q11.2



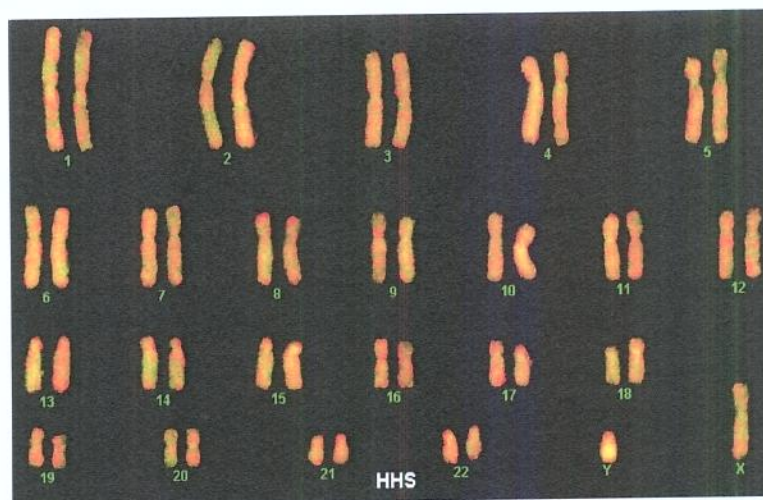
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



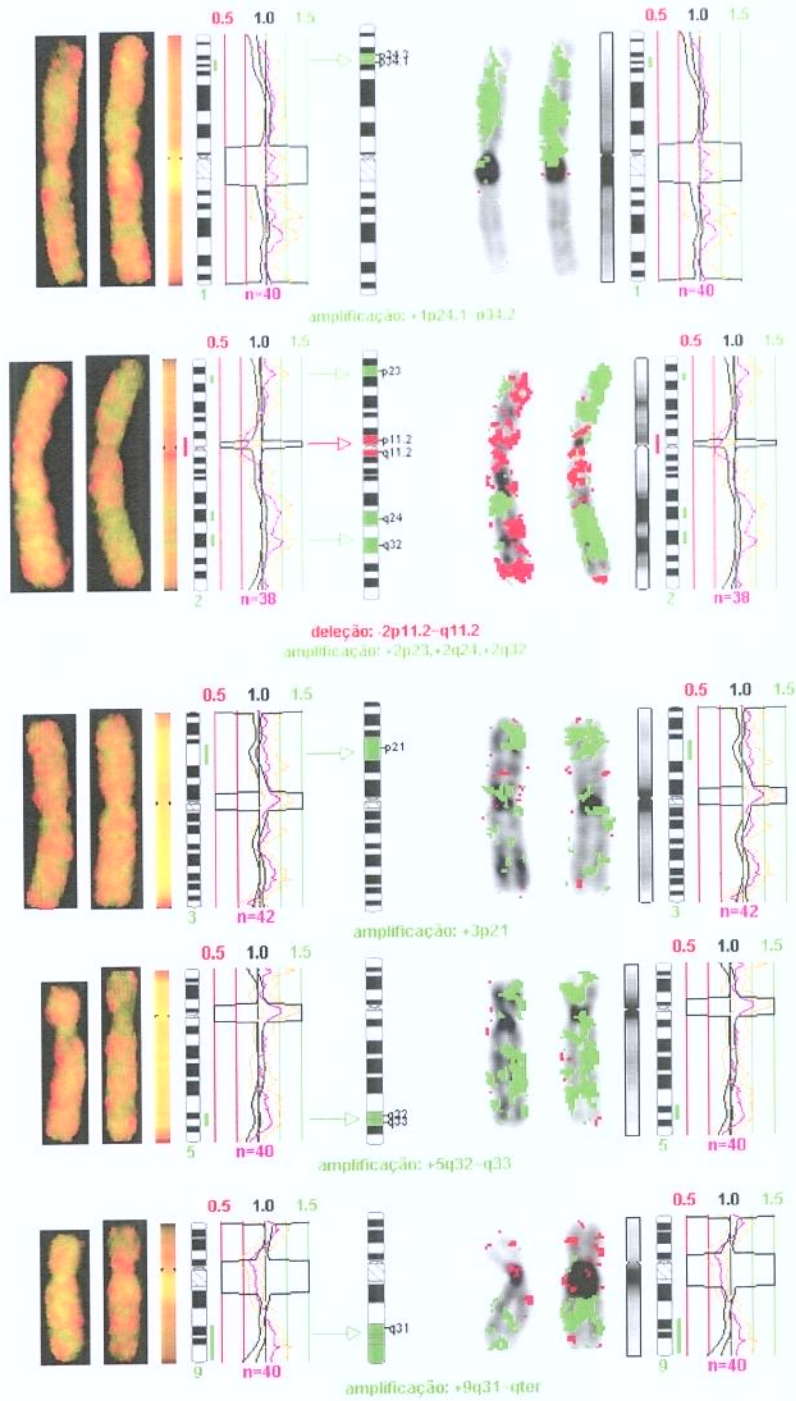
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

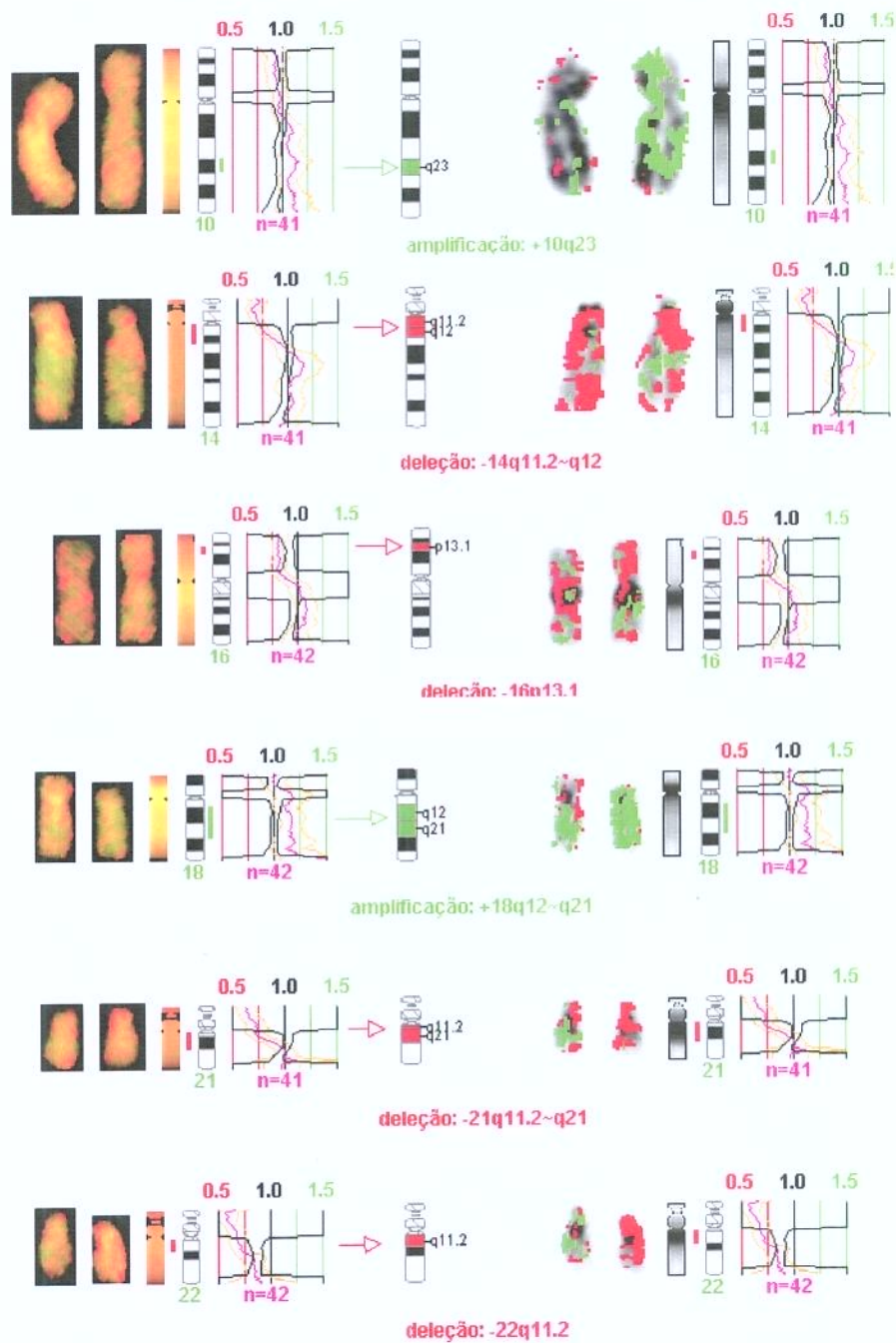
Caso 12: HHS

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

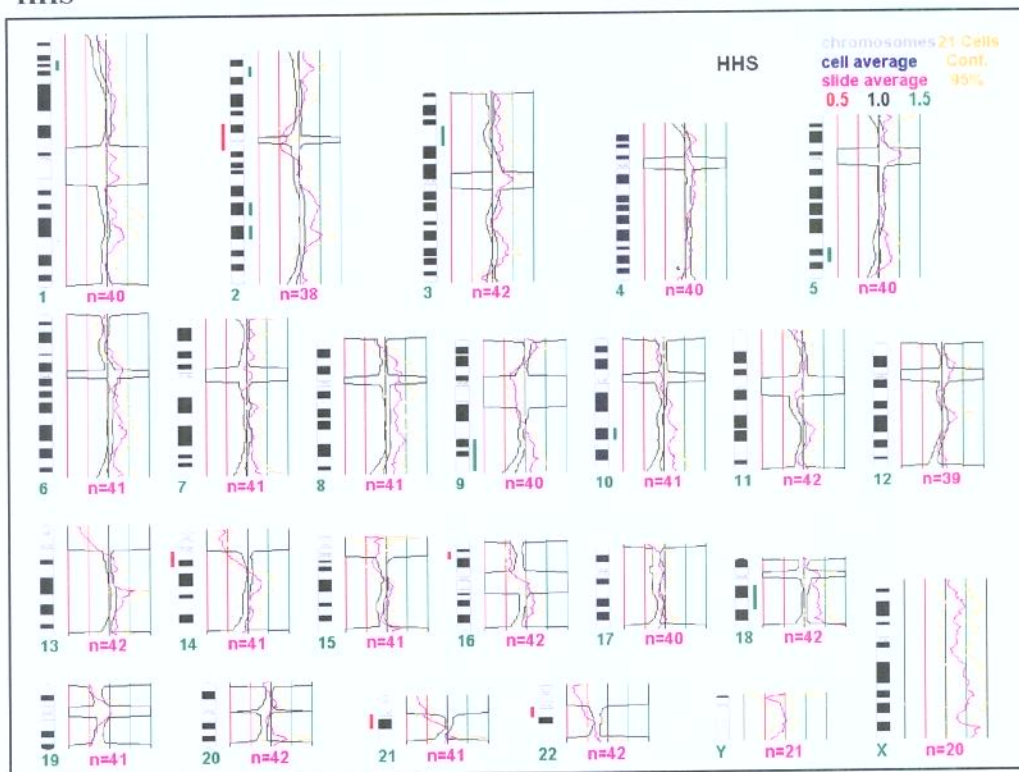


Caso 12 : HHS

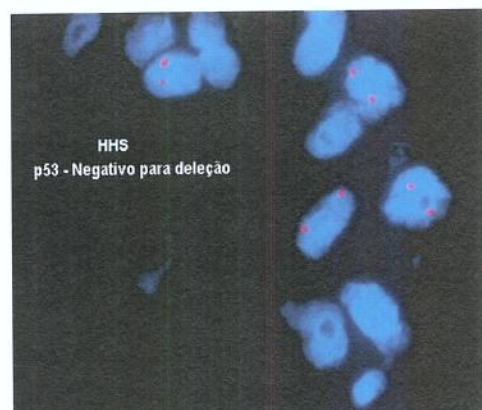
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



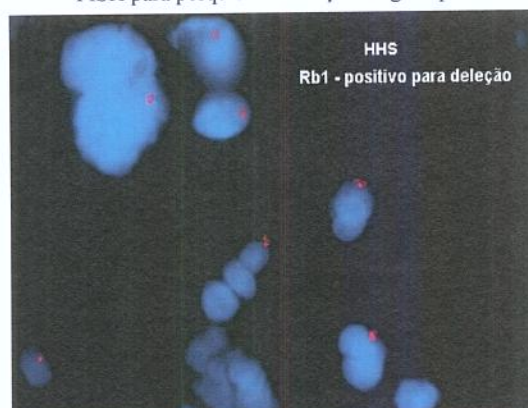
Caso 12: HHS



Profile



FISH para pesquisa da deleção do gene p53



FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 13: IAS

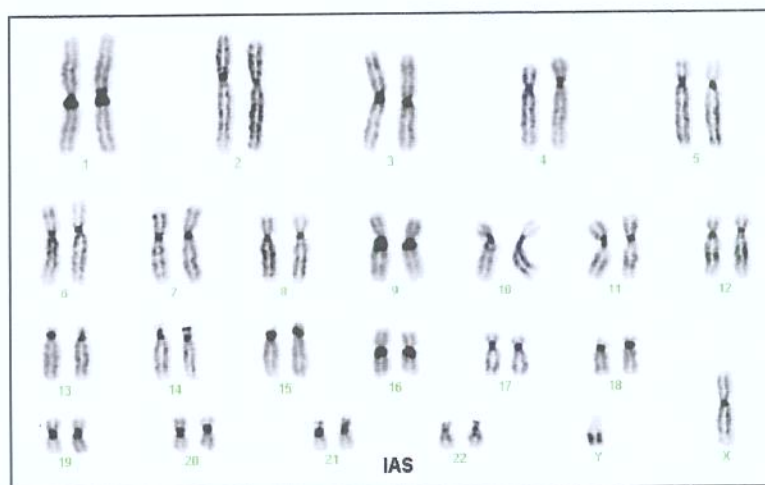
Resultado: +1p13~p34.3,+1q23~q41,+2p16~p25,+2q24,+2q35~qter,+3p12~q25,+4p16,+4q12,+4q22~q27,+5q23~q34,+8p12,+8q24.1~qter,+13q14~qter,-14q11.2,+14q31~qter,+15q22~q23,-16p12~p13.1+16q13~q21,+18q,-21q11.2~q21,+22q13



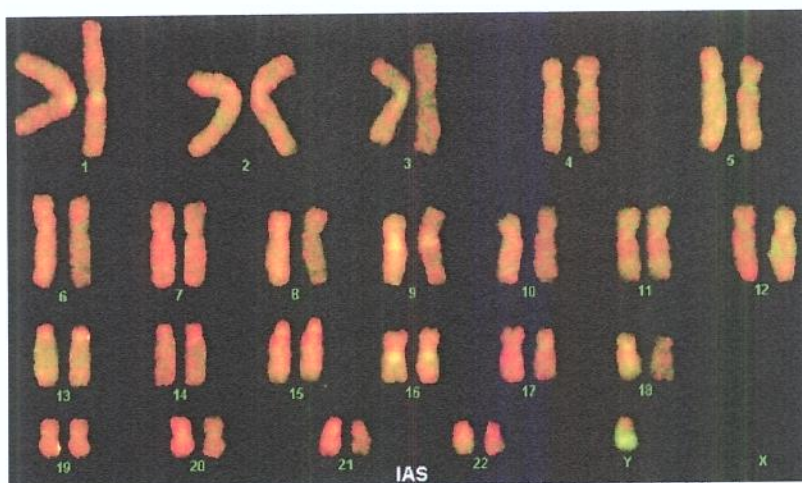
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



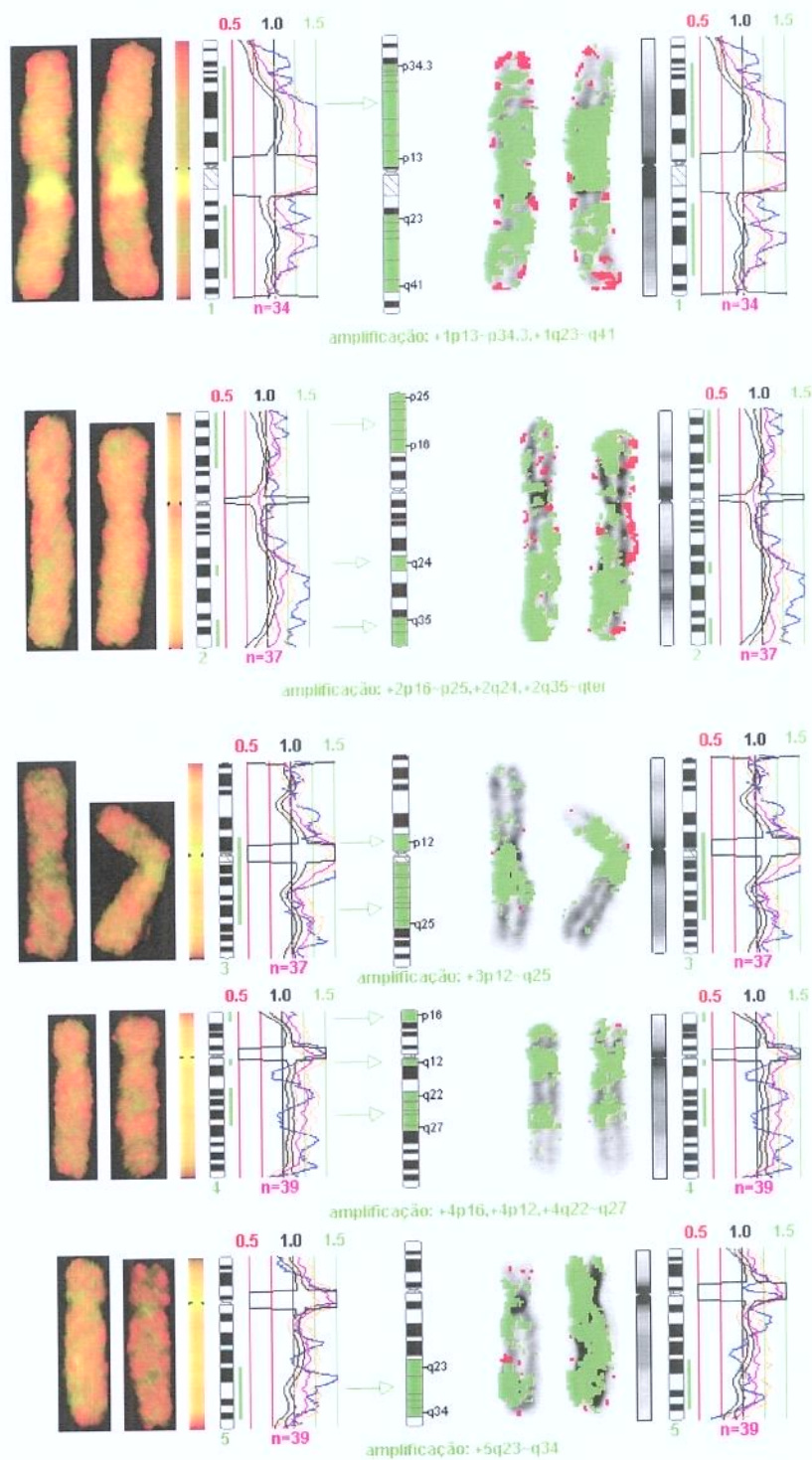
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

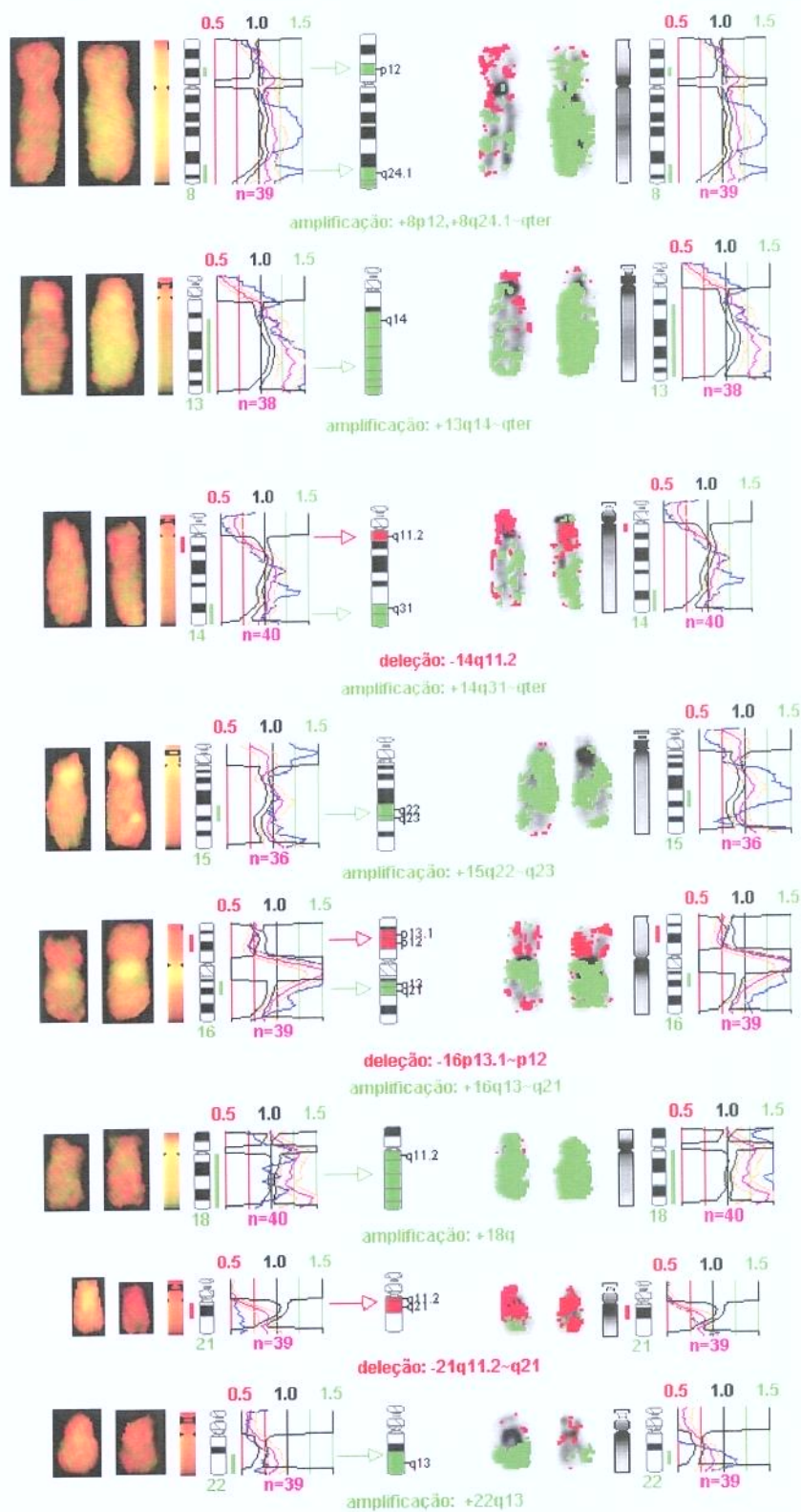
Caso 13: IAS

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

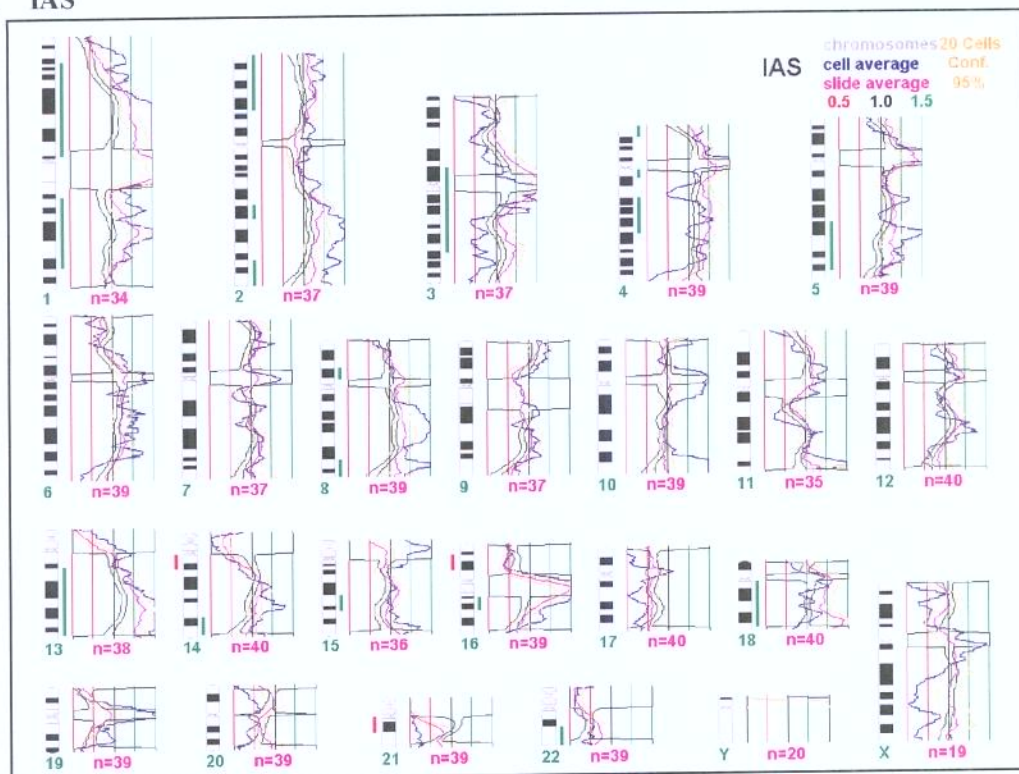


Caso 13: IAS

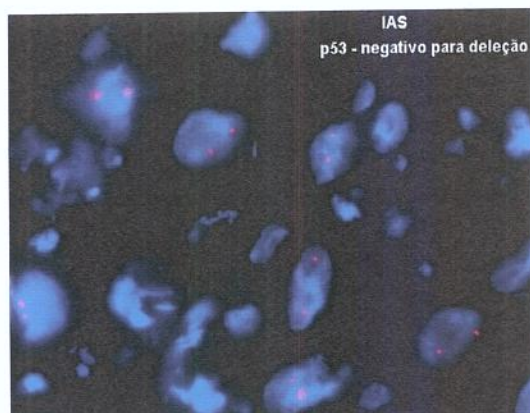
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



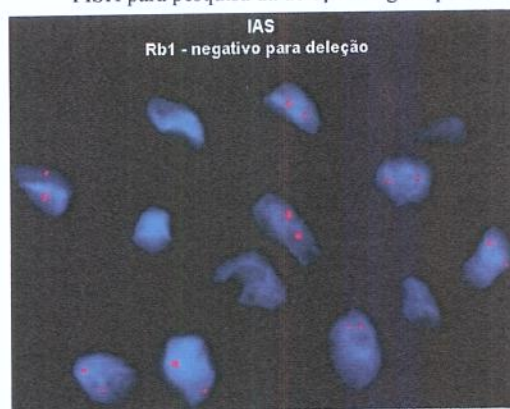
Caso 13: IAS



Profile



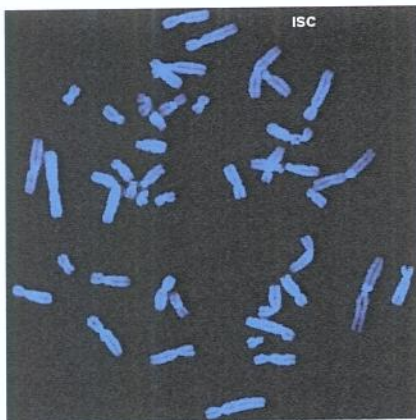
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



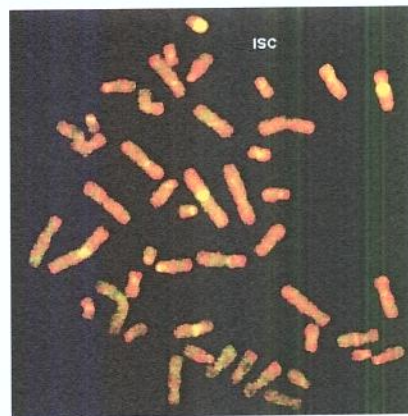
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 14: ISC

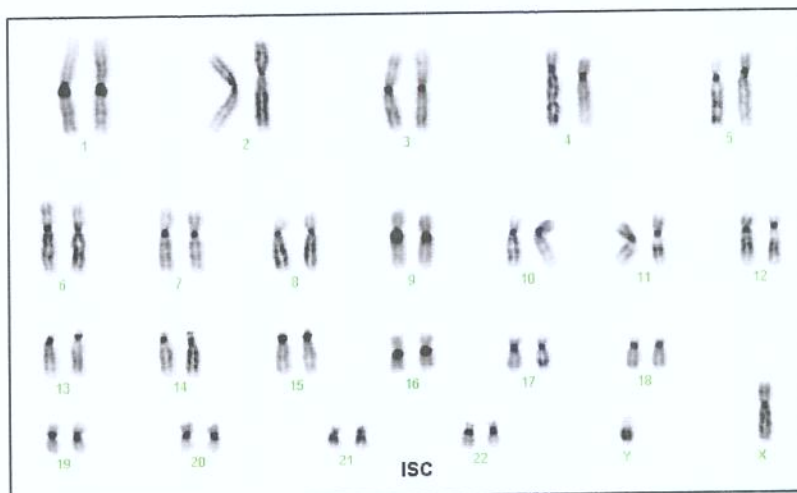
Resultado: +1p13~p31,+1p35,+2p16~p22,+ 6p12~p21.3,+7q31,+8p11.2~qter, +9q21, -14q11.2,-15q11.2~q14,+16q24, -19q13.3~qter



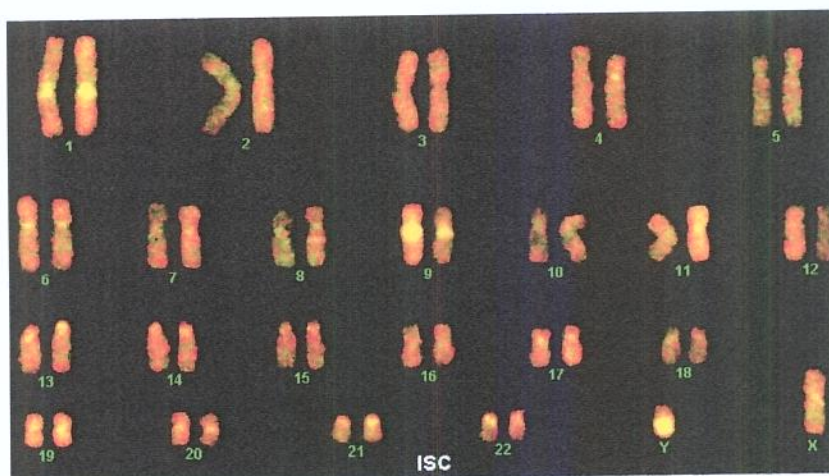
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

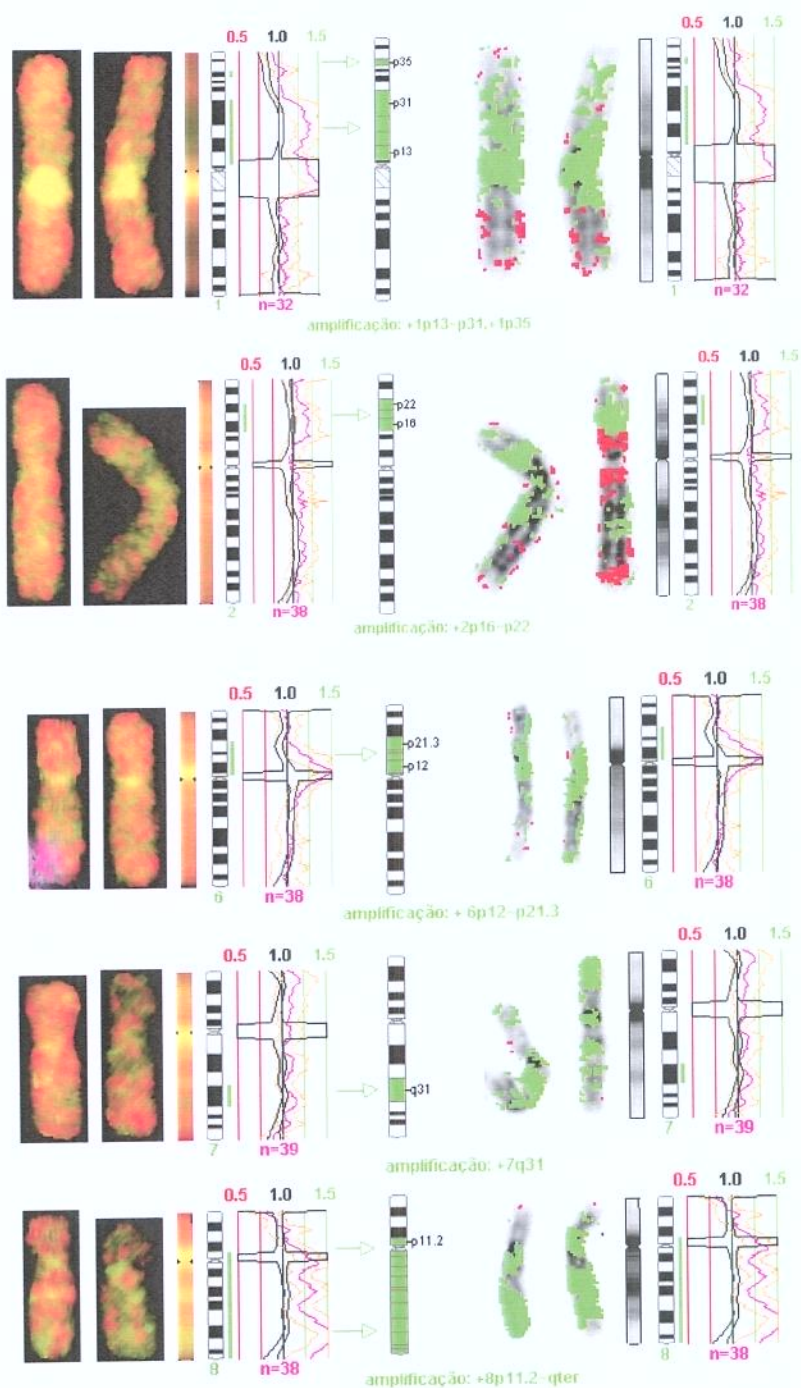


Cariótipo DAPI invertido

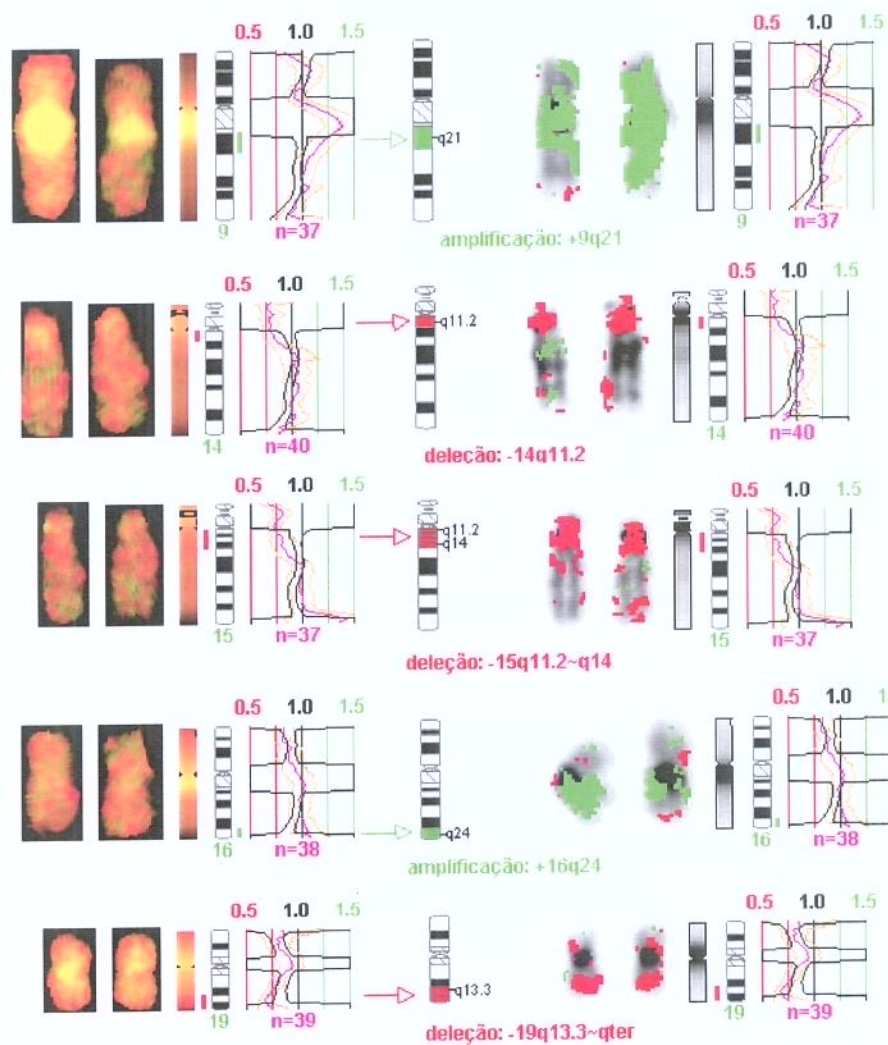


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

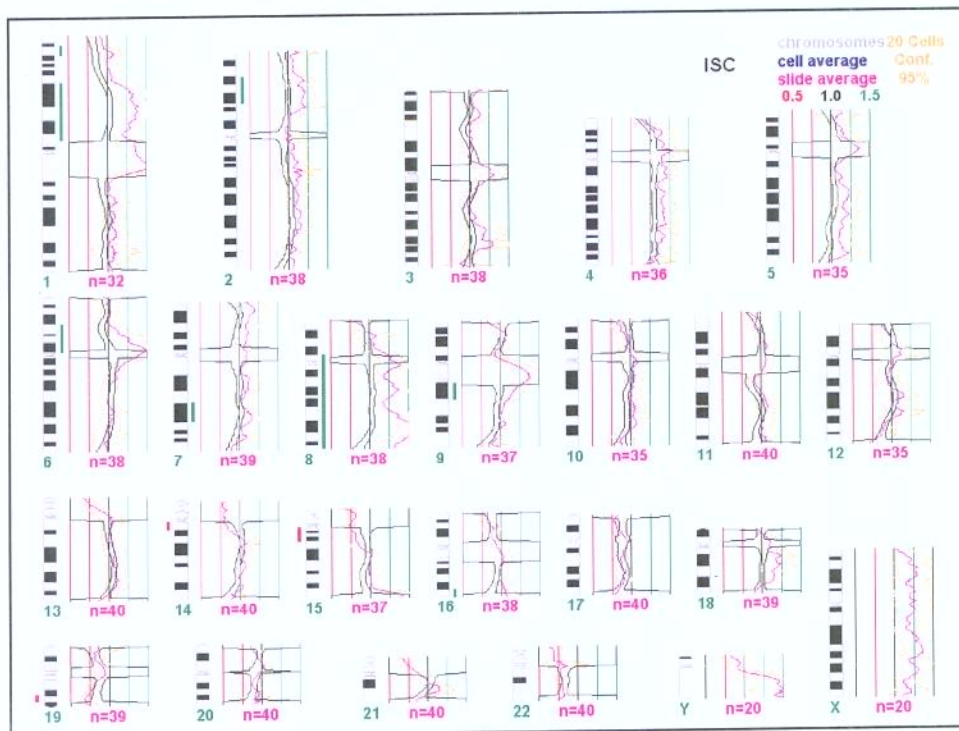
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



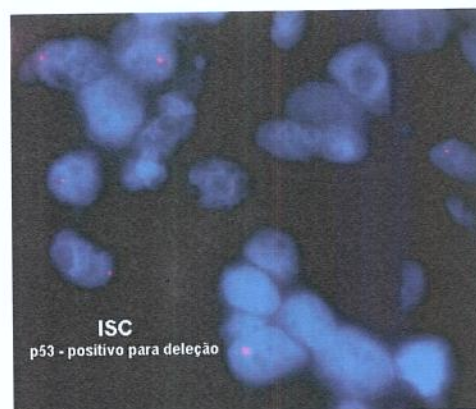
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



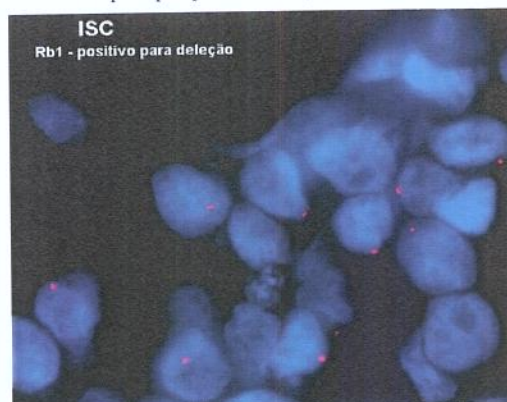
Caso 14: ISC



Profile



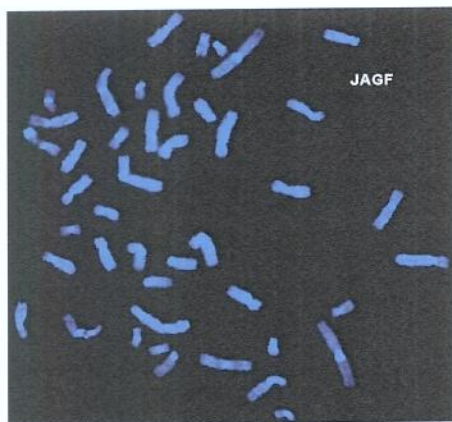
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



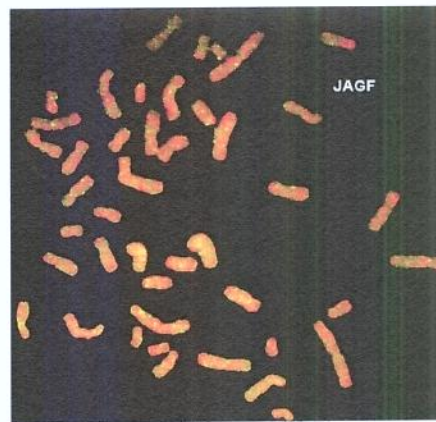
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 15: JAGF

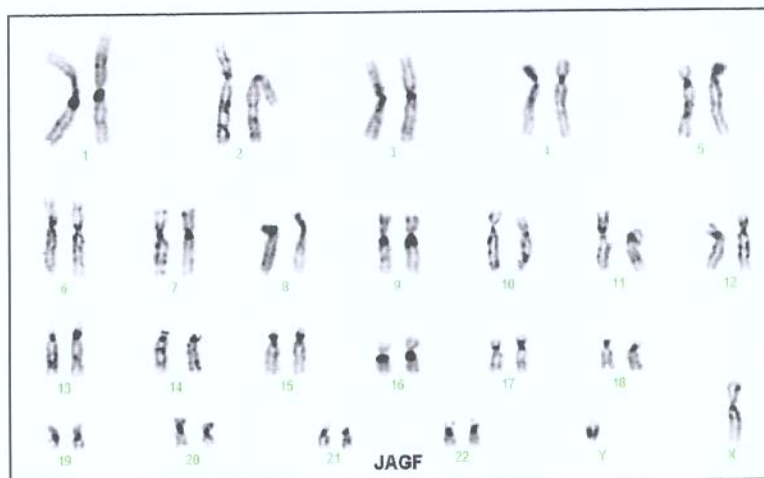
Resultado: +1p34.2 ~ 34.3 , +1q32 , +2p16 ~ p24 , + 3p24 ~ pter, +3q12~q22,+4p13~p15.1, +5q23~q32,+6p12~p21.3,+8q11.2~q12,+8q24.2,-9p13~p21,+9q34,+11q12~q13, +12q12~q13,+12q24.3,+13q34,-14q11.2~q12,+14q24~qter,-15q13~q15,+19p



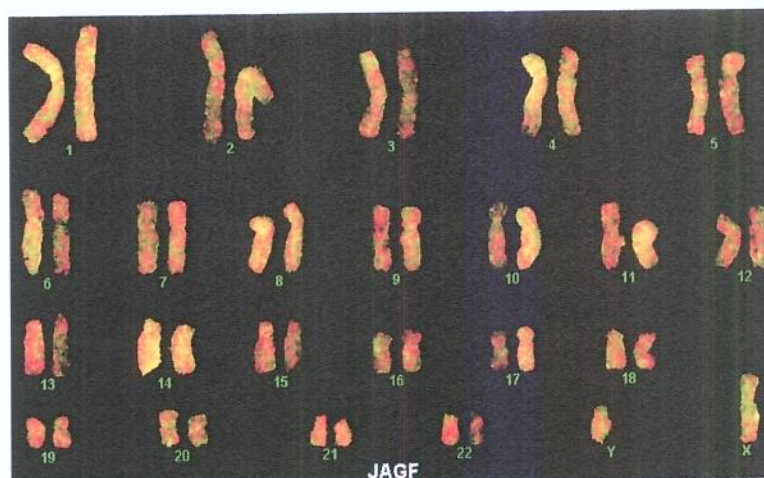
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

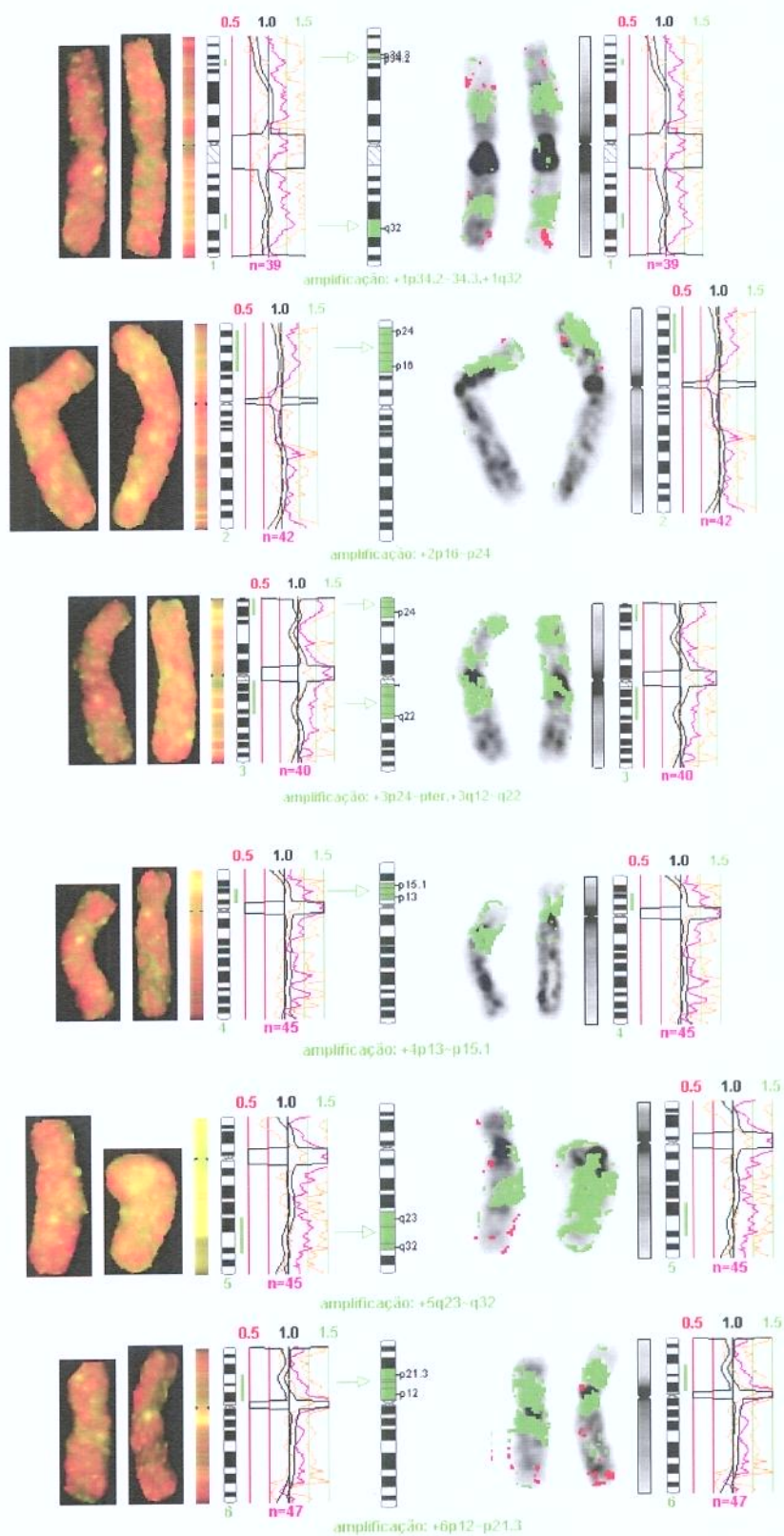


Cariótipo DAPI invertido



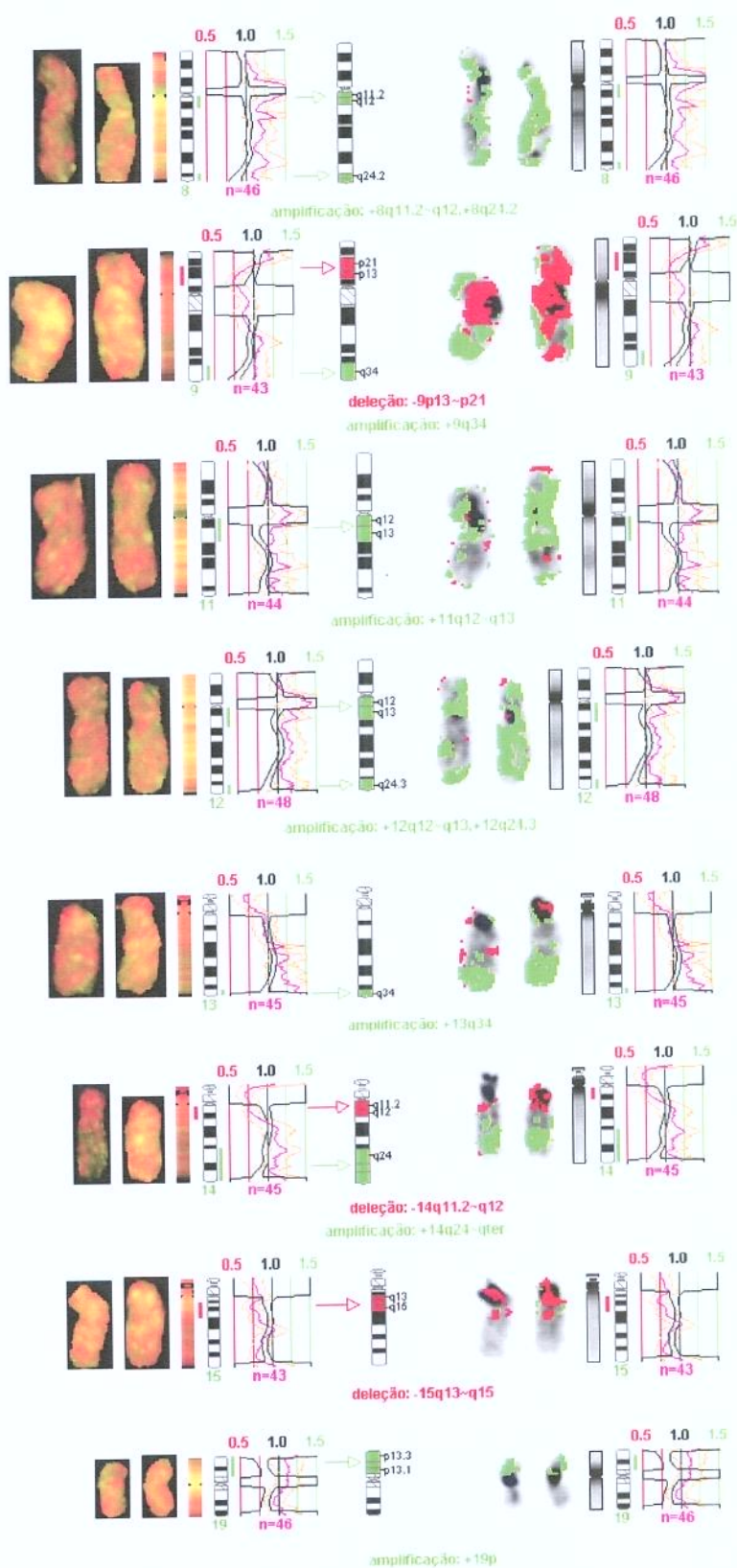
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

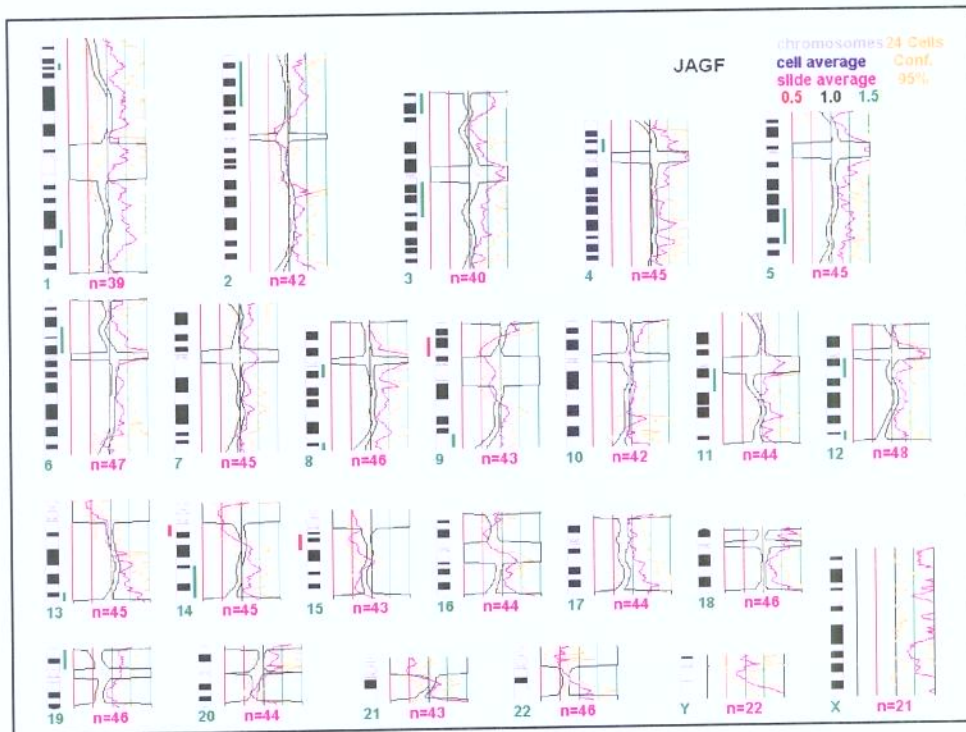


Caso 15: JAGF

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 15: JAGF



Profile



FISH para pesquisa da deleção do gene p53



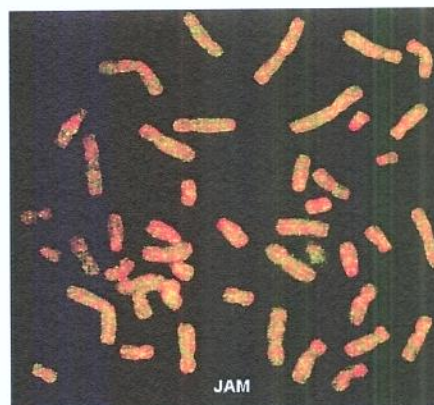
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 16: JAM

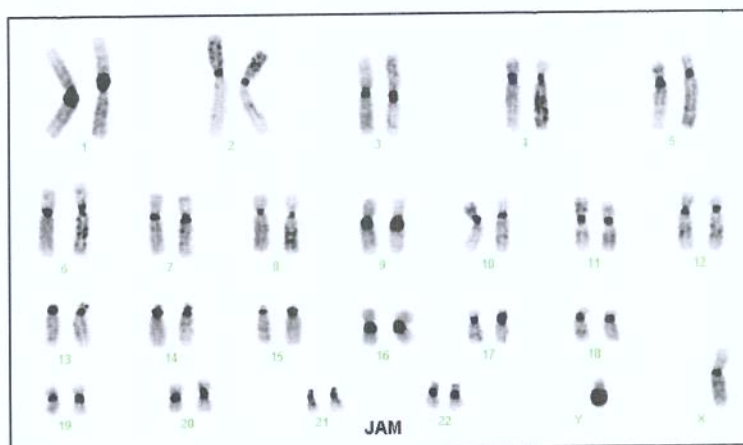
Resultado: +1p22~p34.2,+2p14~pter,+2q,+3p21,+3q12~q26.3,+5q14~q31,+6p12~q24,+7q22~qter,+8q24.2~qter,-9p13,-9q21,+8q34,+10q21~qter,+11p15~q13,+12q13~qter,+13q21~qter,-14q11.2,+14q23~qter,-15q11.2~q12,+15q23~q24,-16p11.2~p12,+18q12~qter,-21q11.2~q21



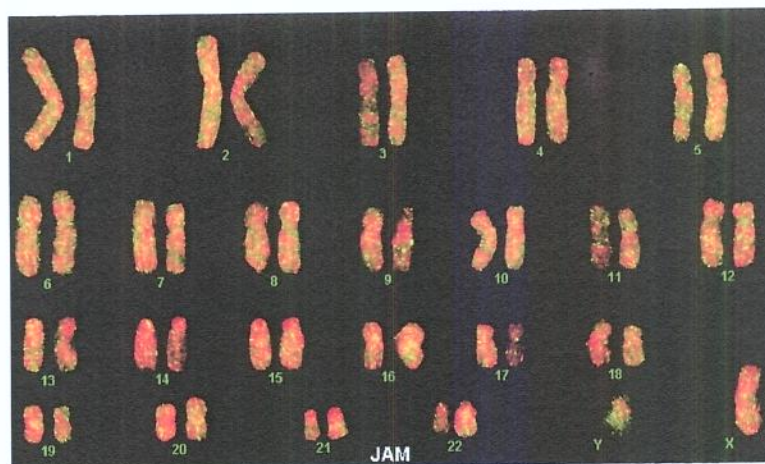
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

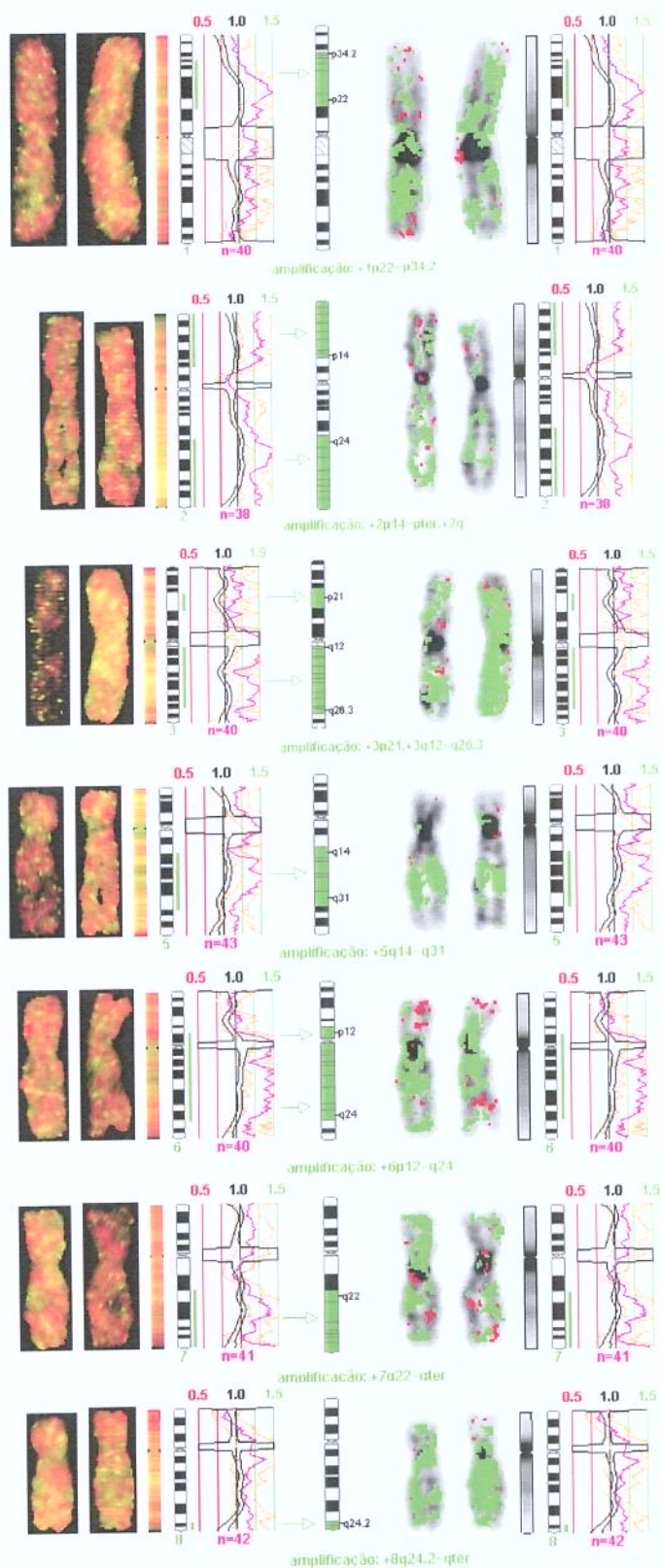


Cariótipo DAPI invertido

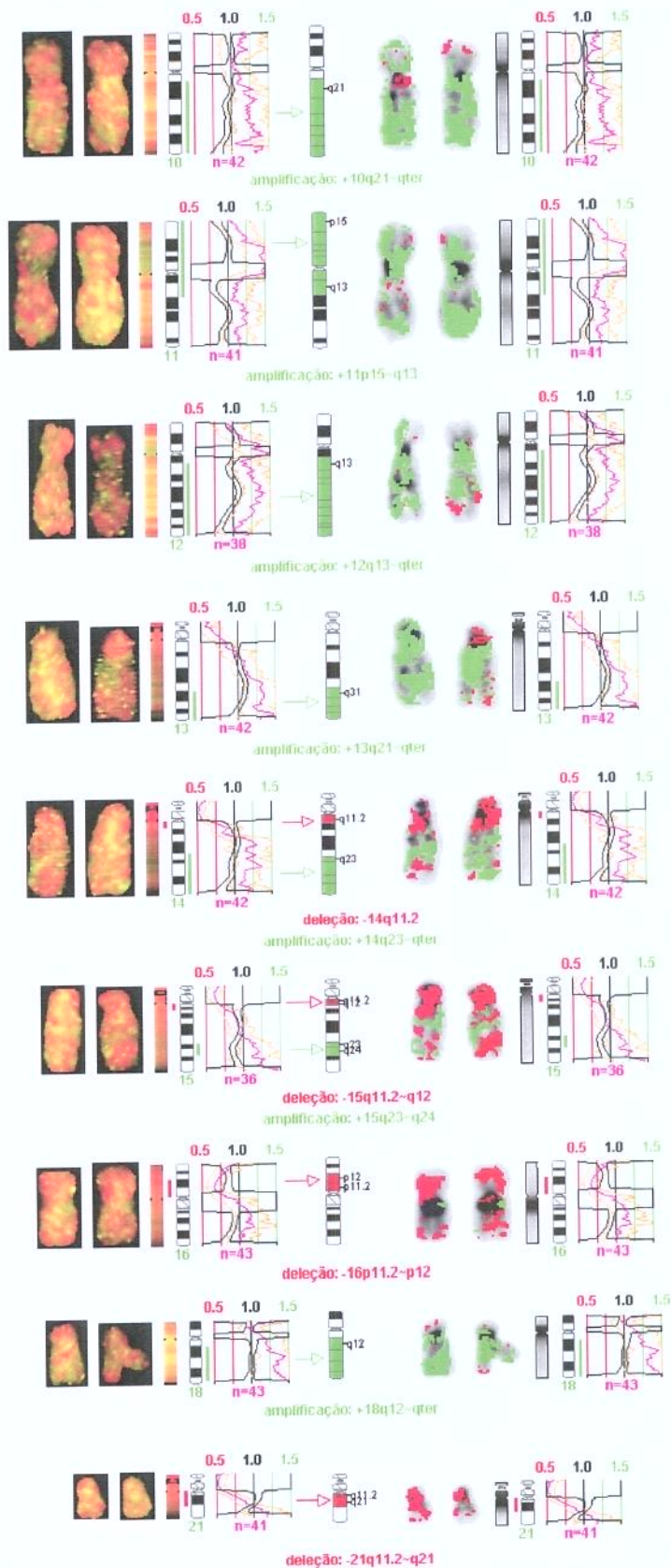


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

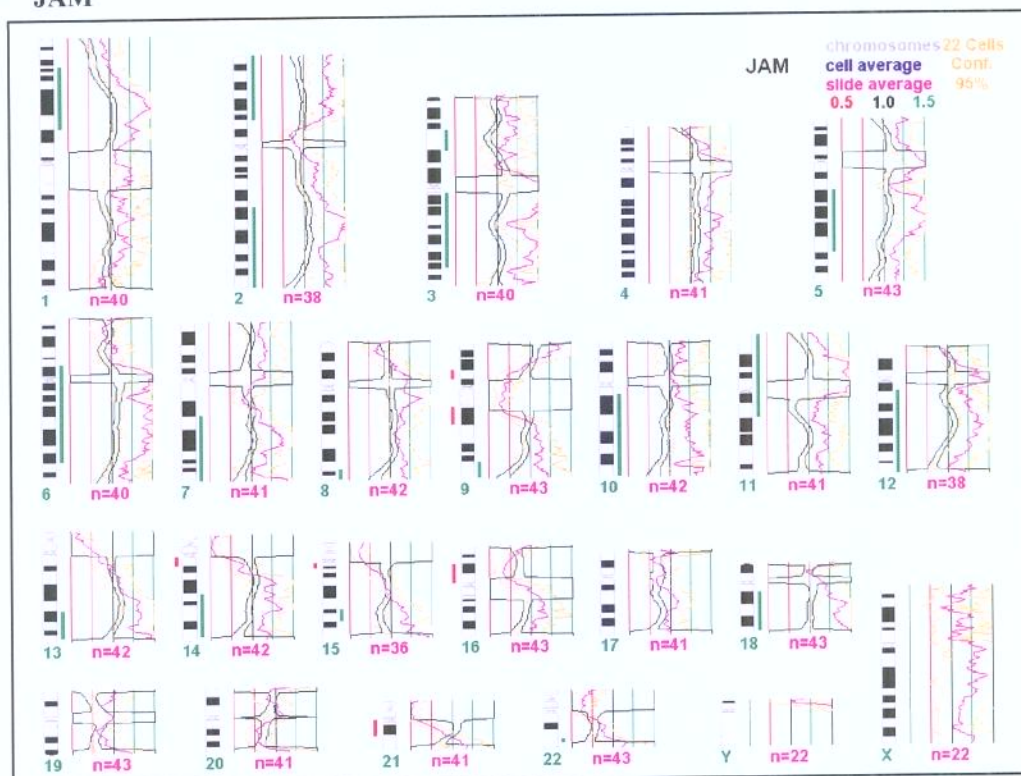
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



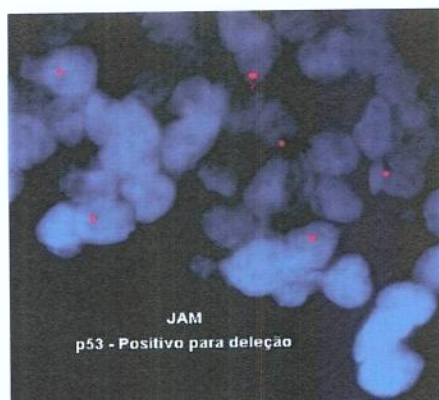
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 16: JAM



Profile



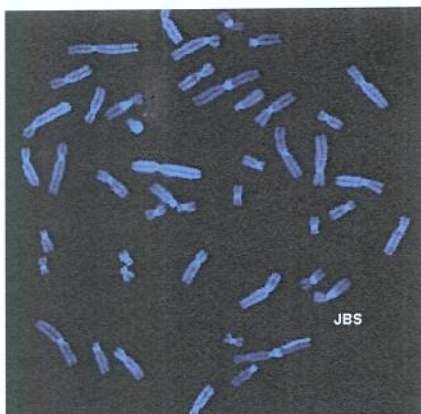
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



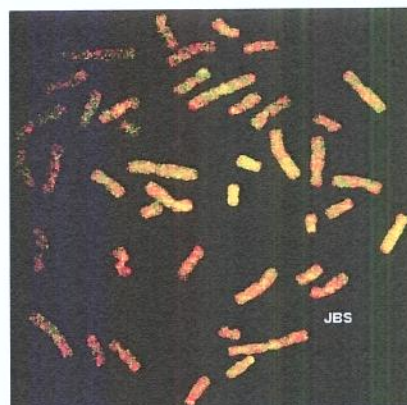
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 17: JBS

Resultado: +2p24~pter,+2q37,+3q12~q13.3,+5q31~qter,+8q24.2~qter,-9q21,+9q34,
+10q26,+11q12~q13,+11q22,+12q24.3,+13q31~qter,+14q32,-15q11.2~q14,
+18q23,+19q13.3,-21q21



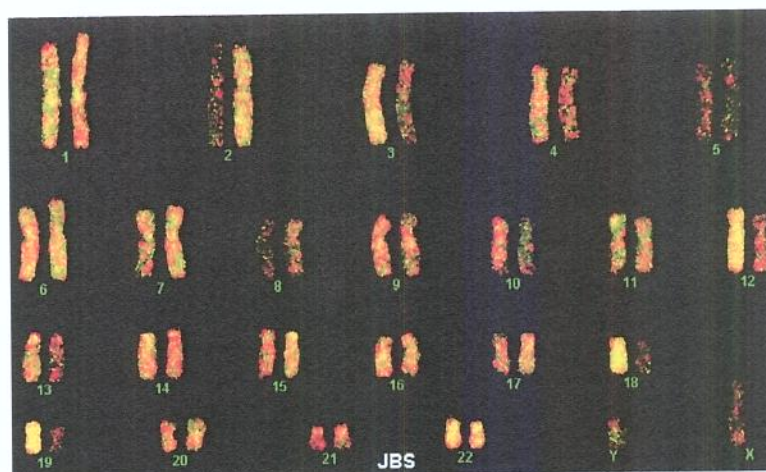
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

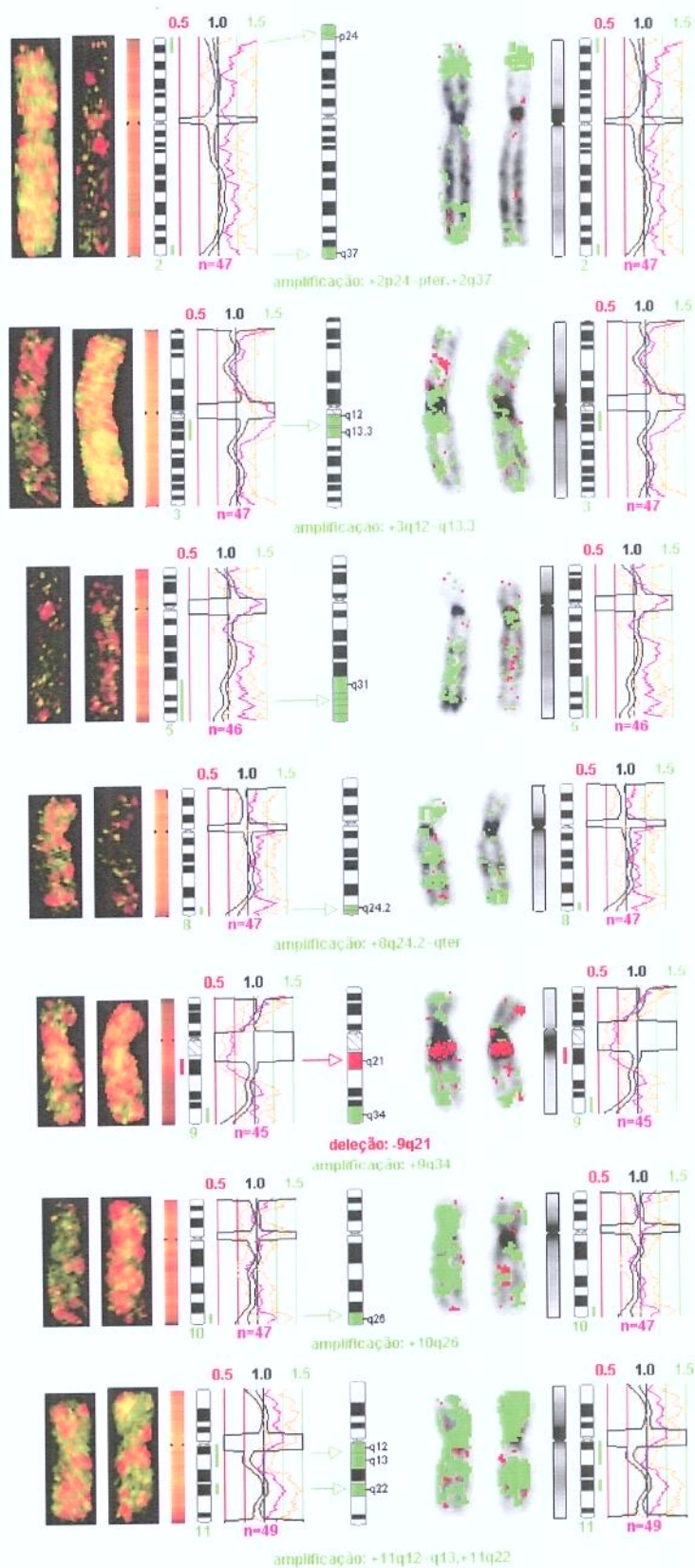


Cariótipo DAPI invertido

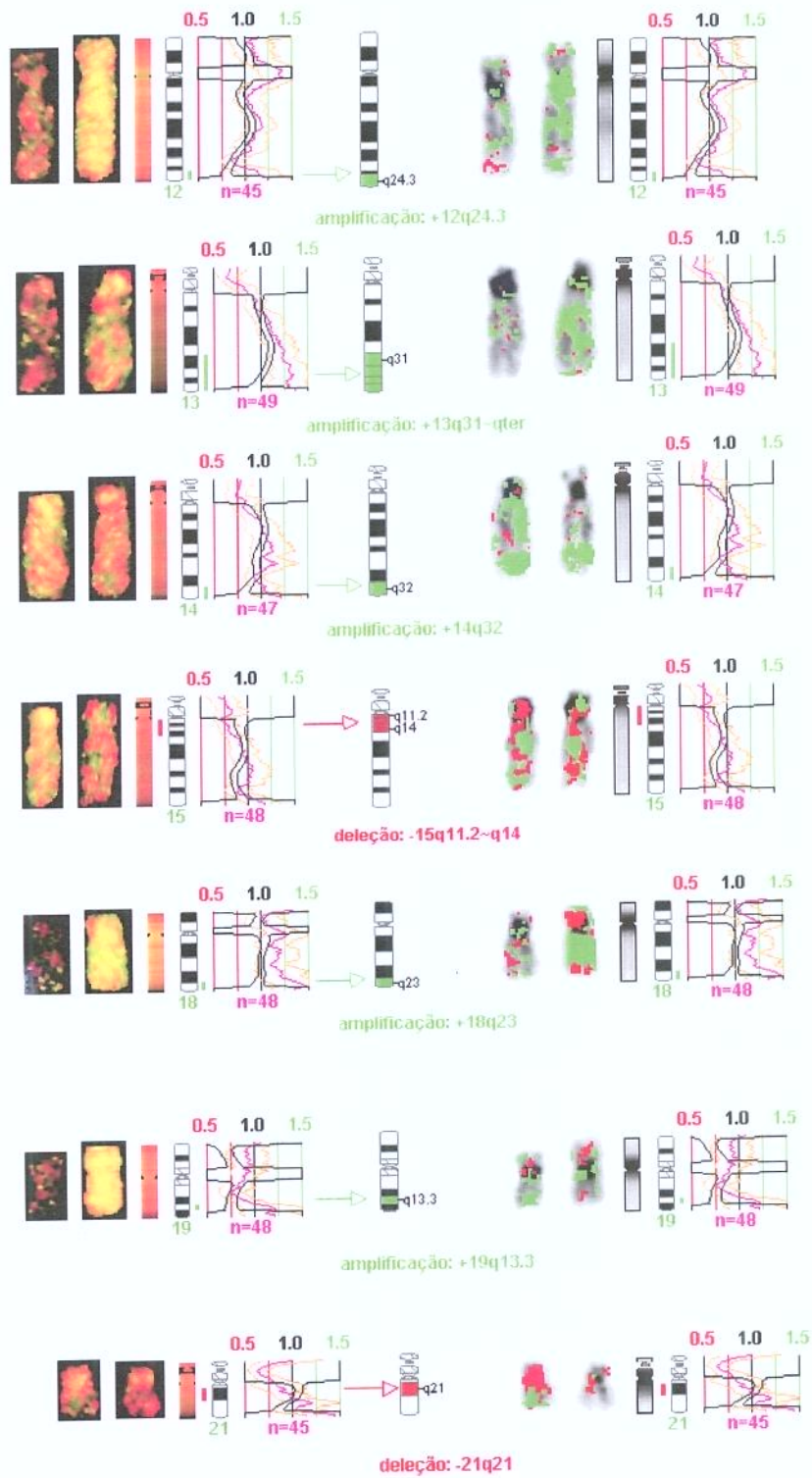


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

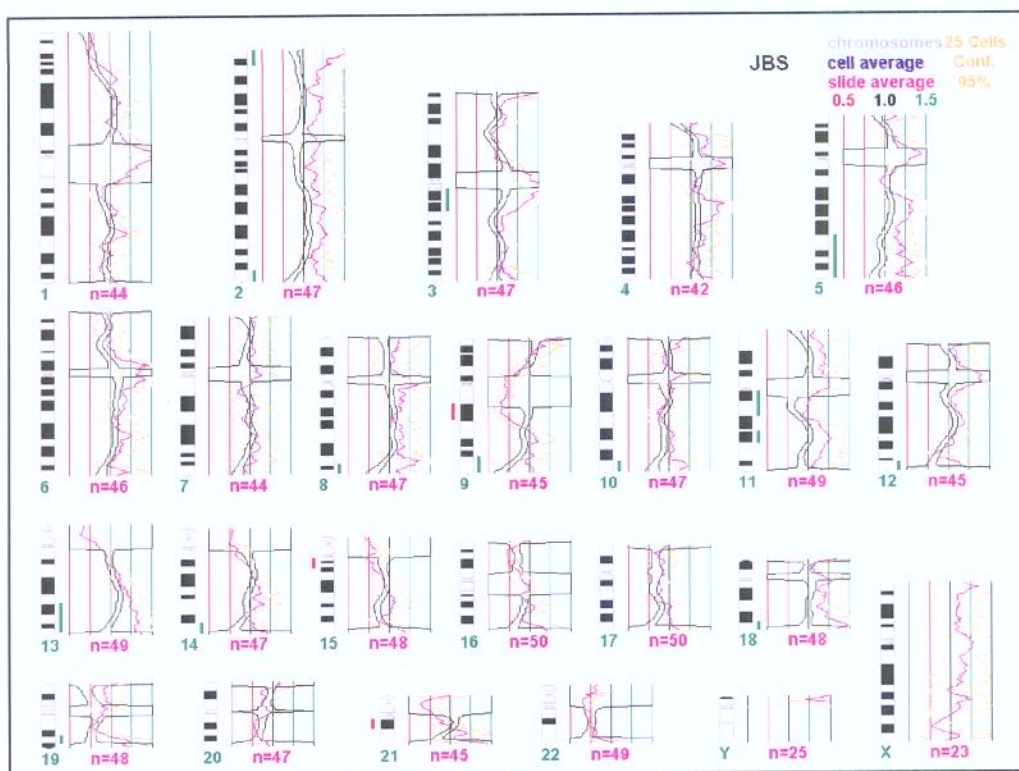
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



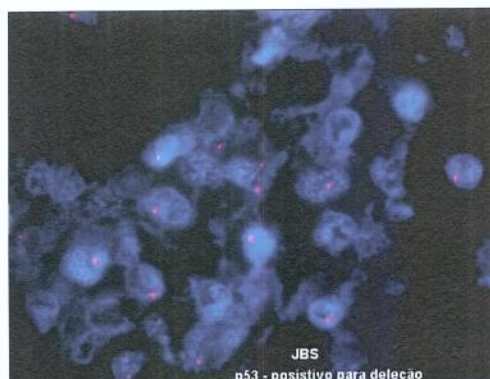
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



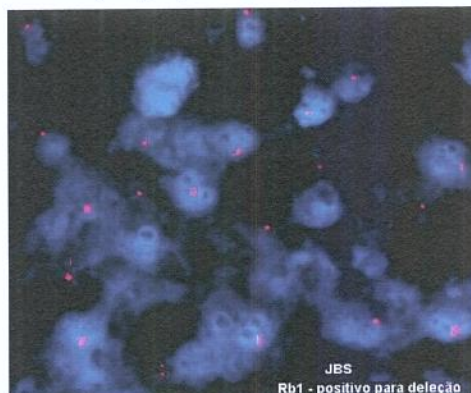
Caso 17: JBS



Profile



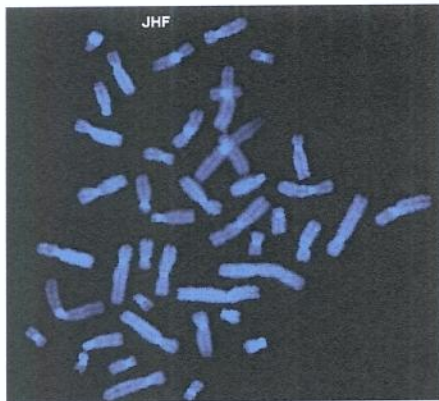
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 18: JHF

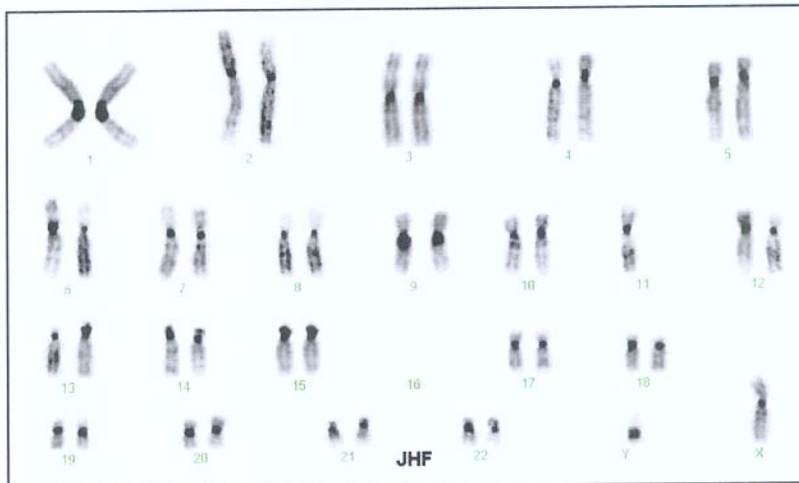
Resultado: +1p32~q44,+2p14~pter,+2q23~qter,+3,+4,+5,+6p21.2~q27,+7p22~q31,+8,+9p21~pter,+9q31~q32,+10p15~q21,+11,+12,+13,+14,+15,+16q12.2~q23,+17q22~qter,+18,+20p11.2,+21q21



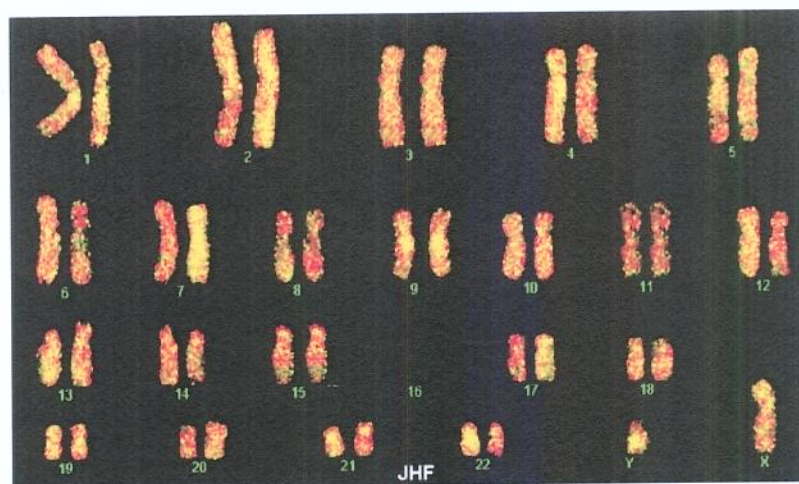
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

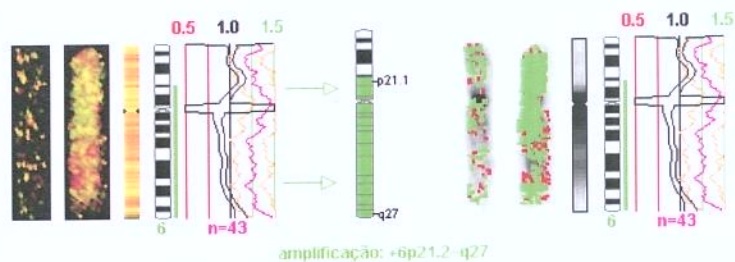
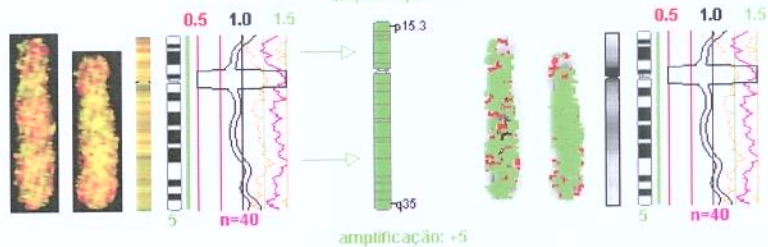
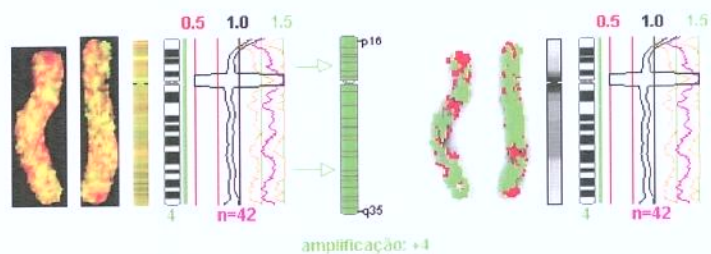
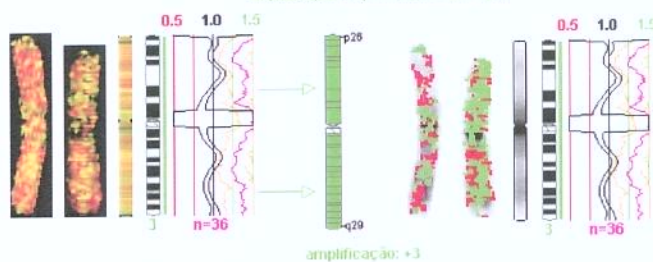
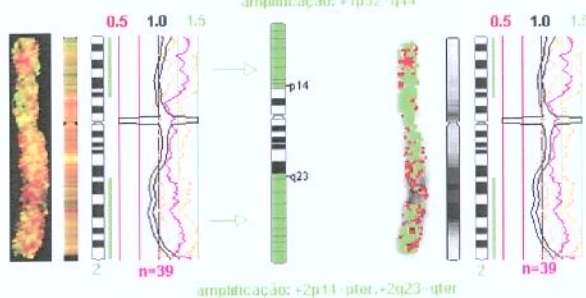
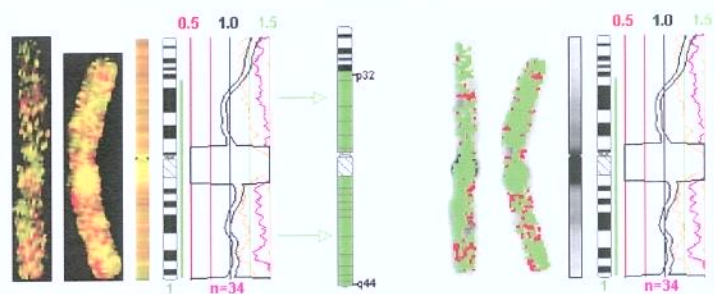


Cariótipo DAPI invertido

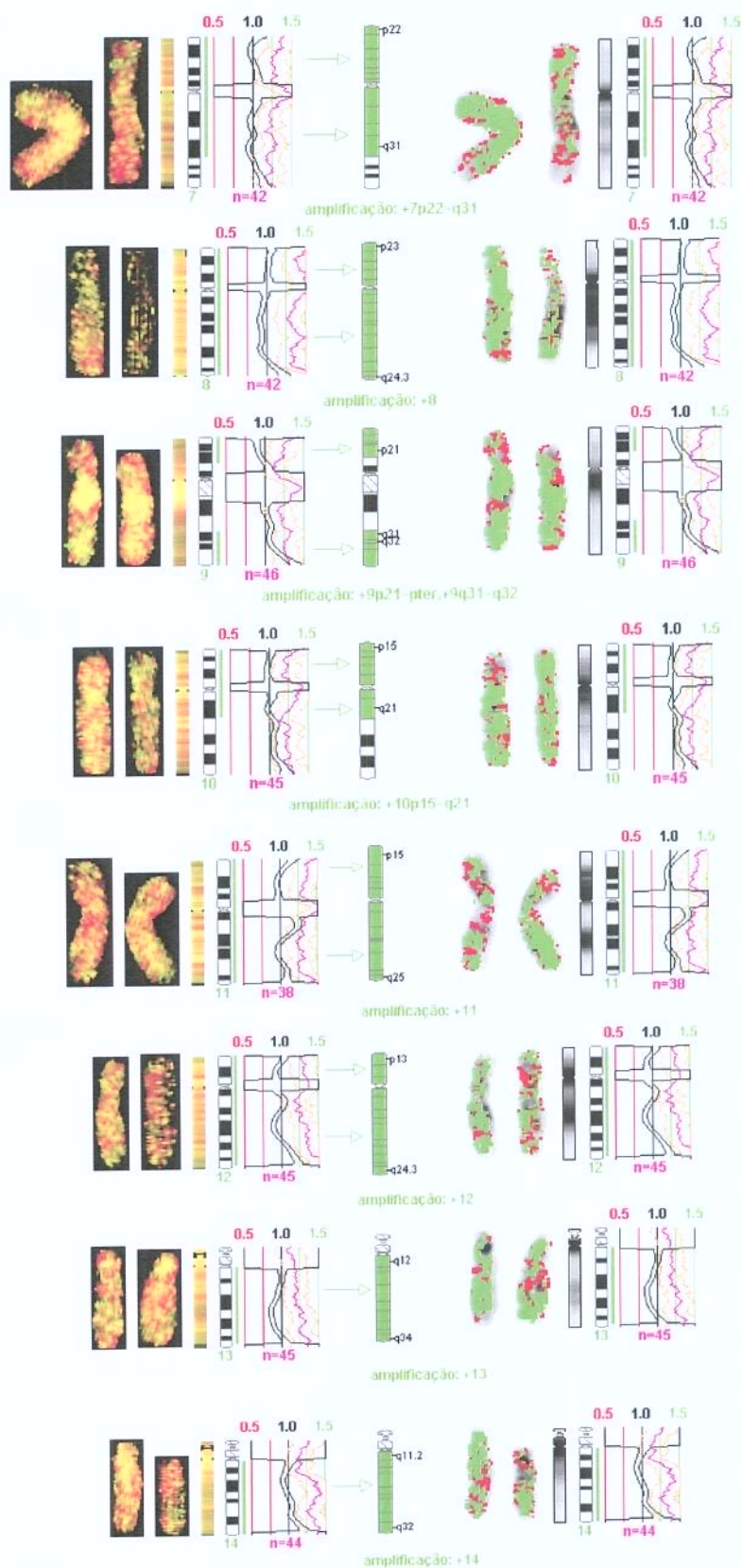


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

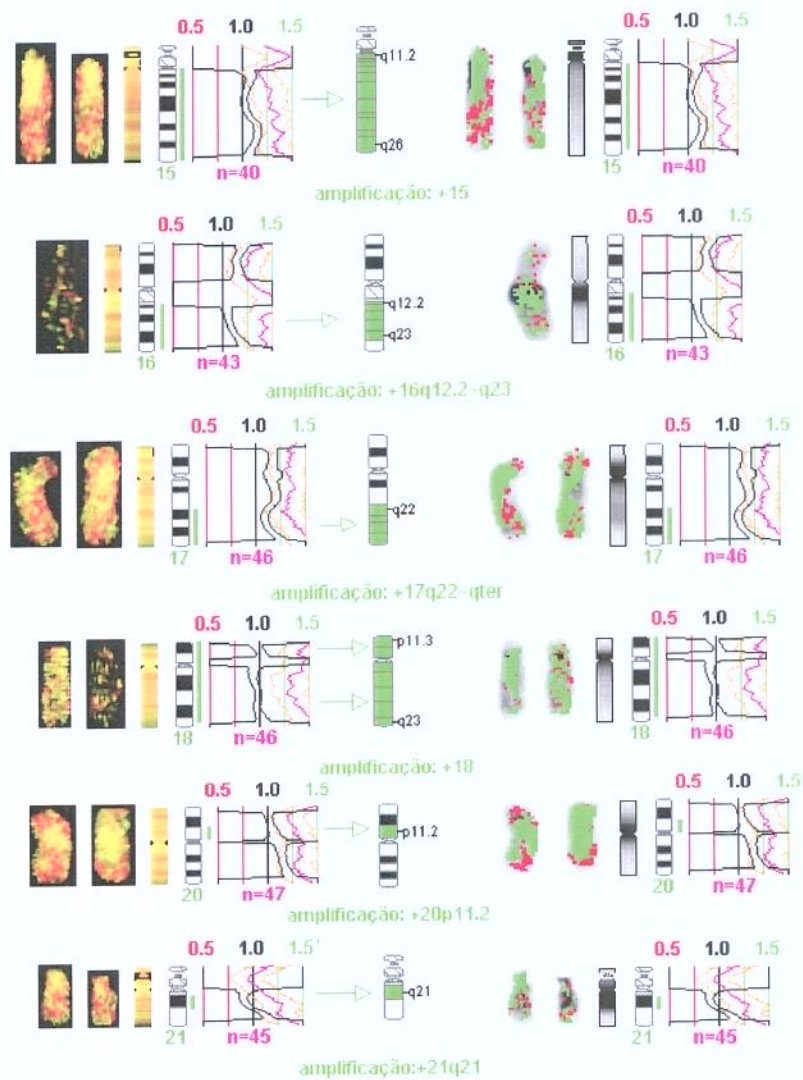
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



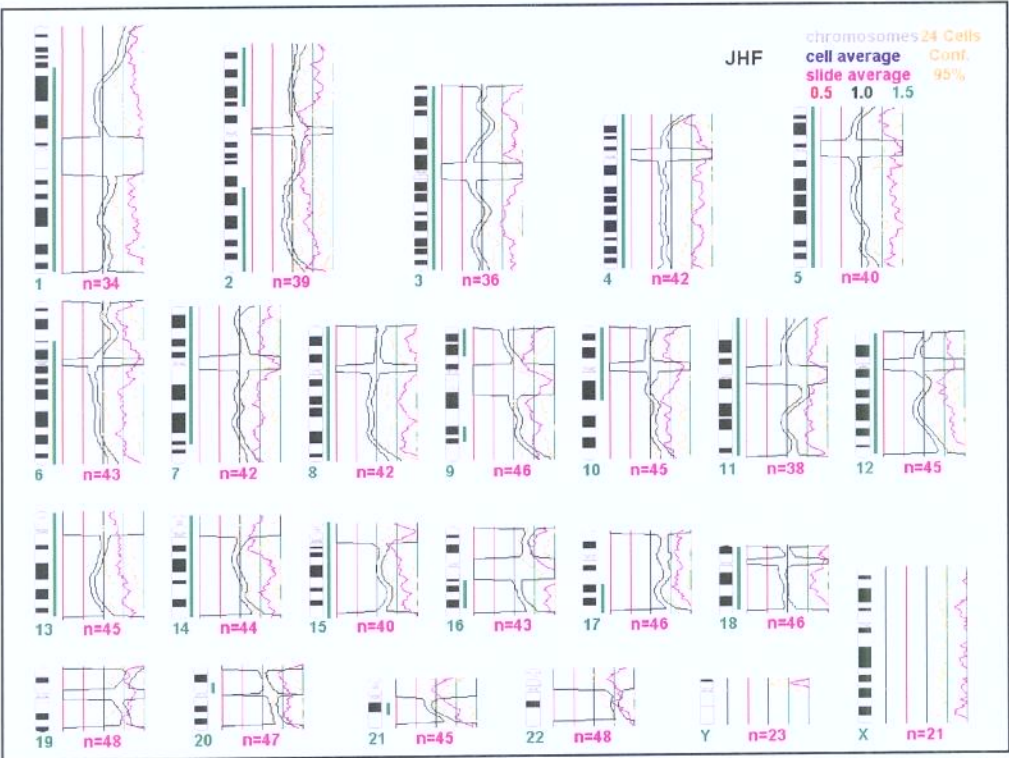
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



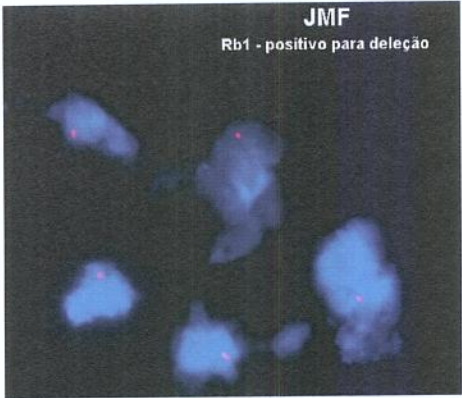
Caso 18: JHF



Profile



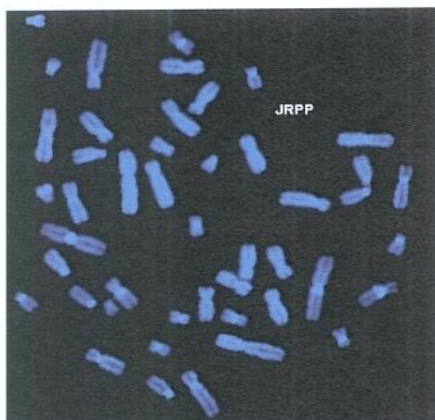
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



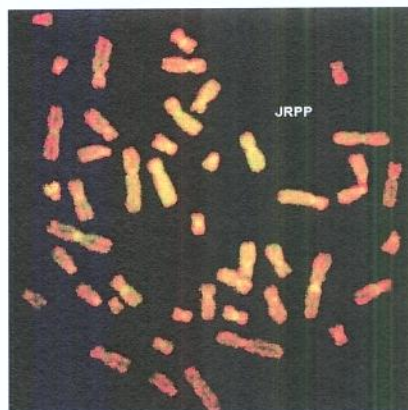
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 19: JRPP

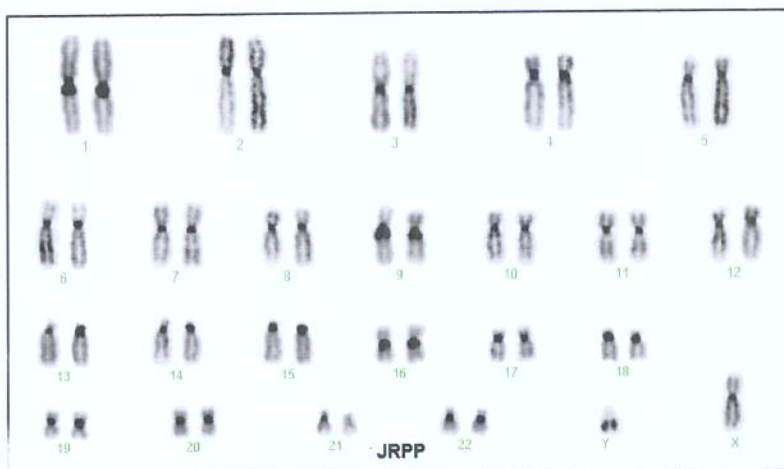
Resultado: +1p22~p31,+3p21~q23,+4q12,+5q22~q32,+6p12~p22,+11q22~q23,+13q32,
-16p12~p13.2,-21q11.2



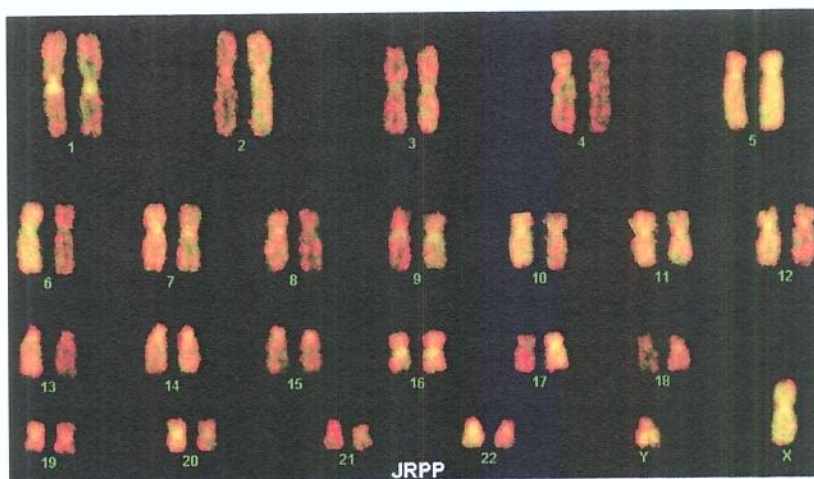
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

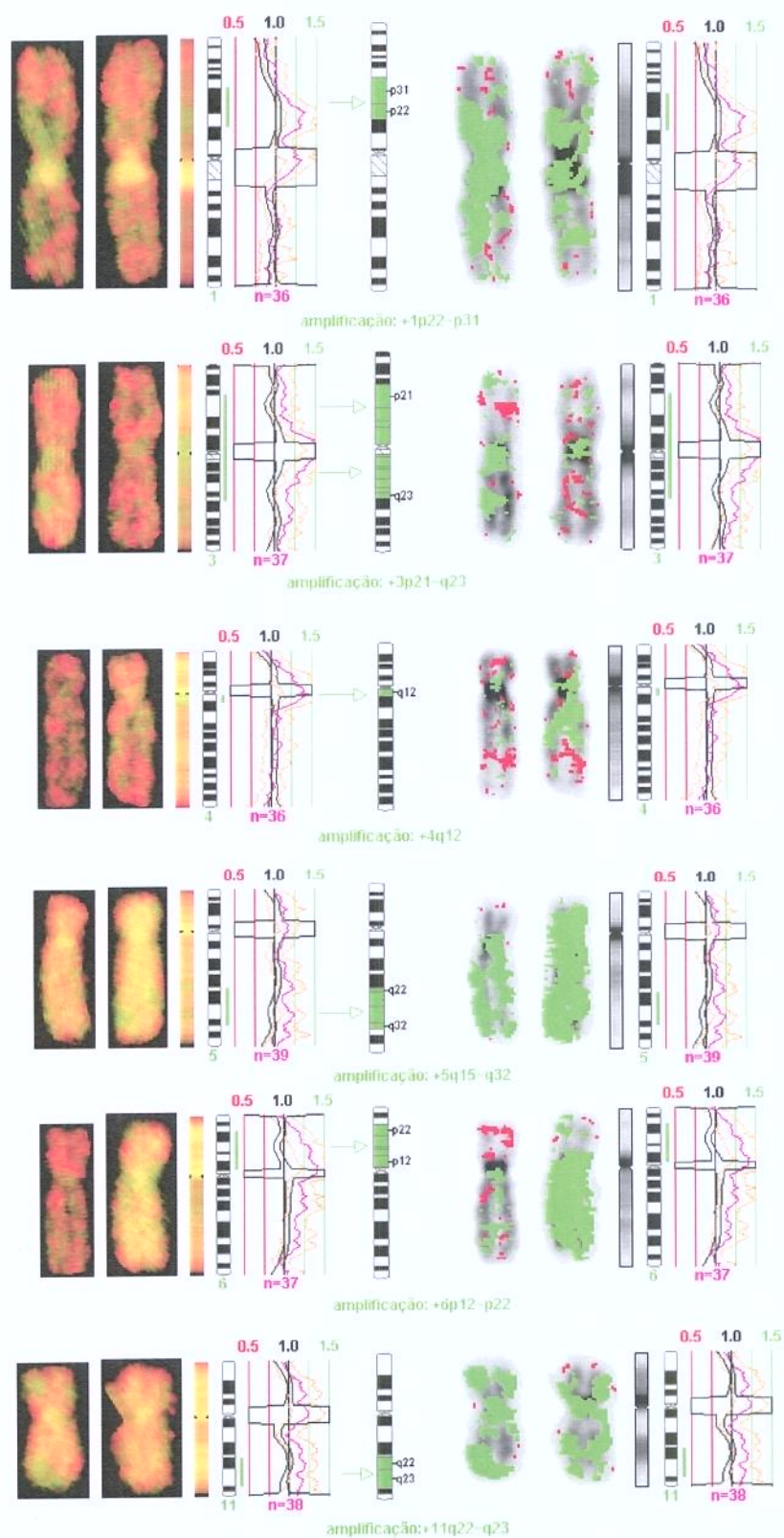


Cariótipo DAPI invertido

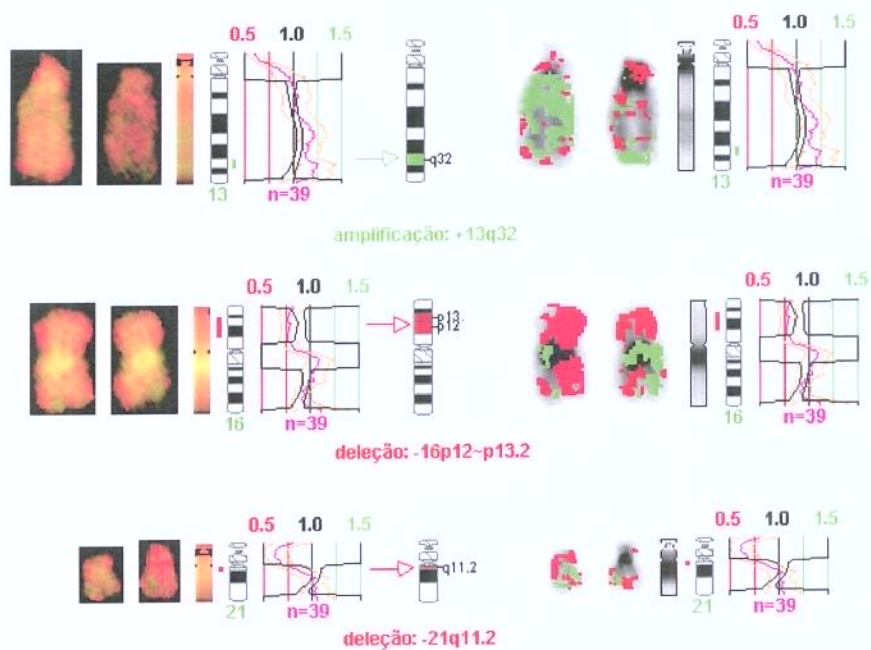


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

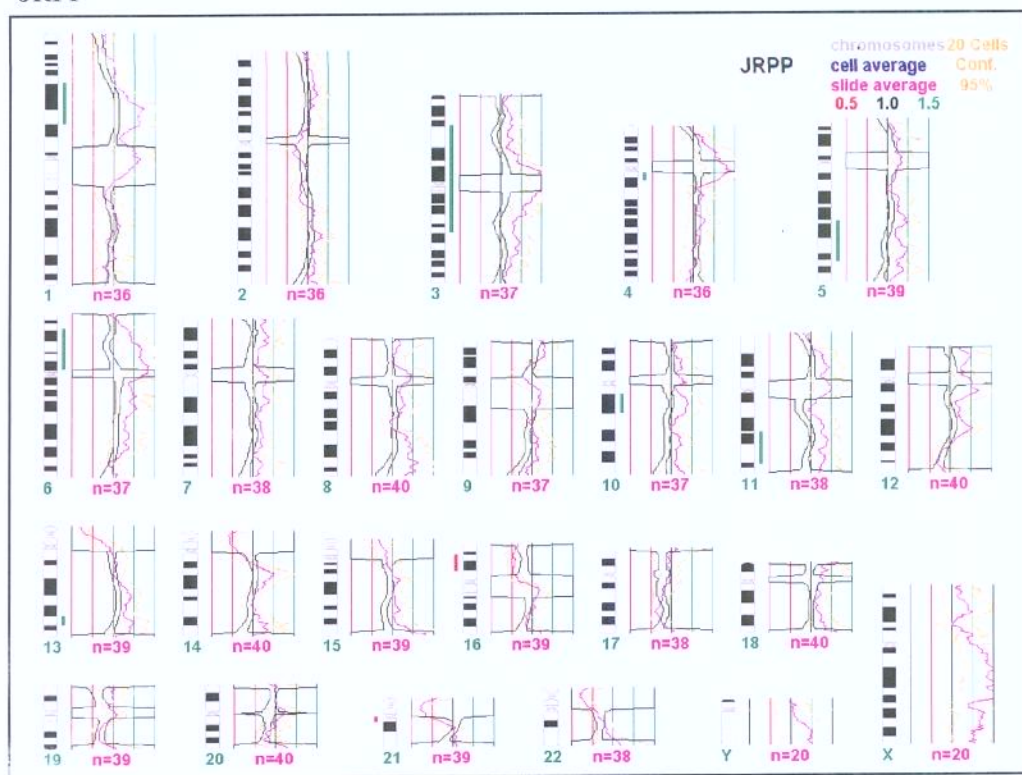
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 19: JRPP



Profile



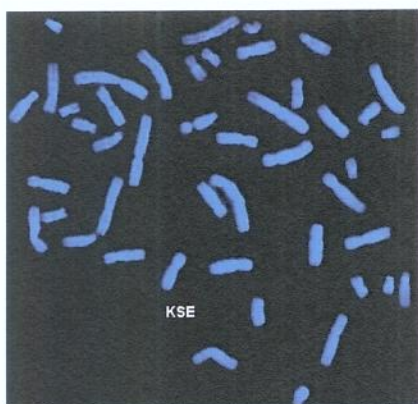
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



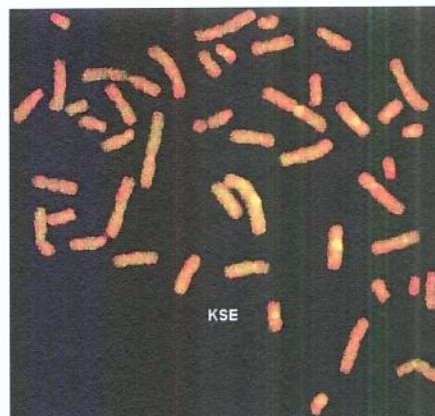
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 20: KSE

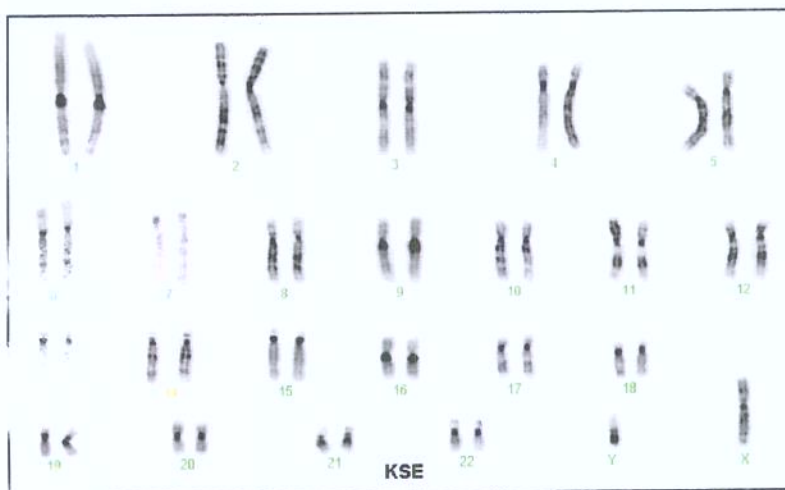
Resultado: +1p32~p35,+1q24~q32,+2p16~pter,+2q22,+3p21,-4p16,+5p14,+5q11.2~q12,+6p12,-15q14~q15,-21q11.2~q21



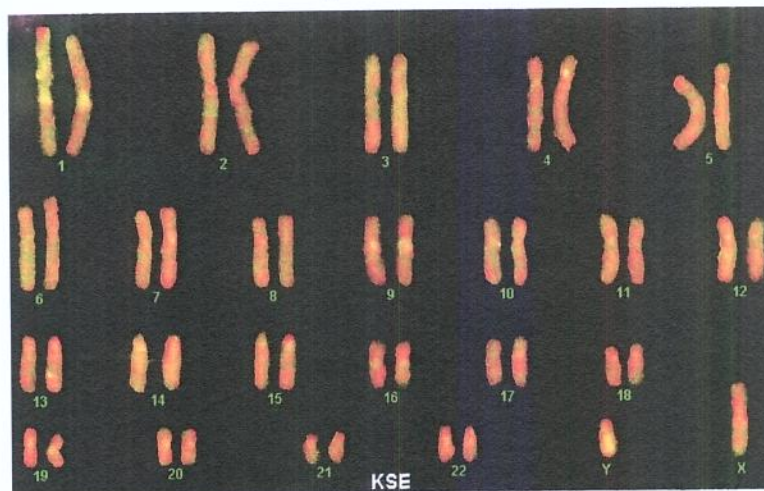
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

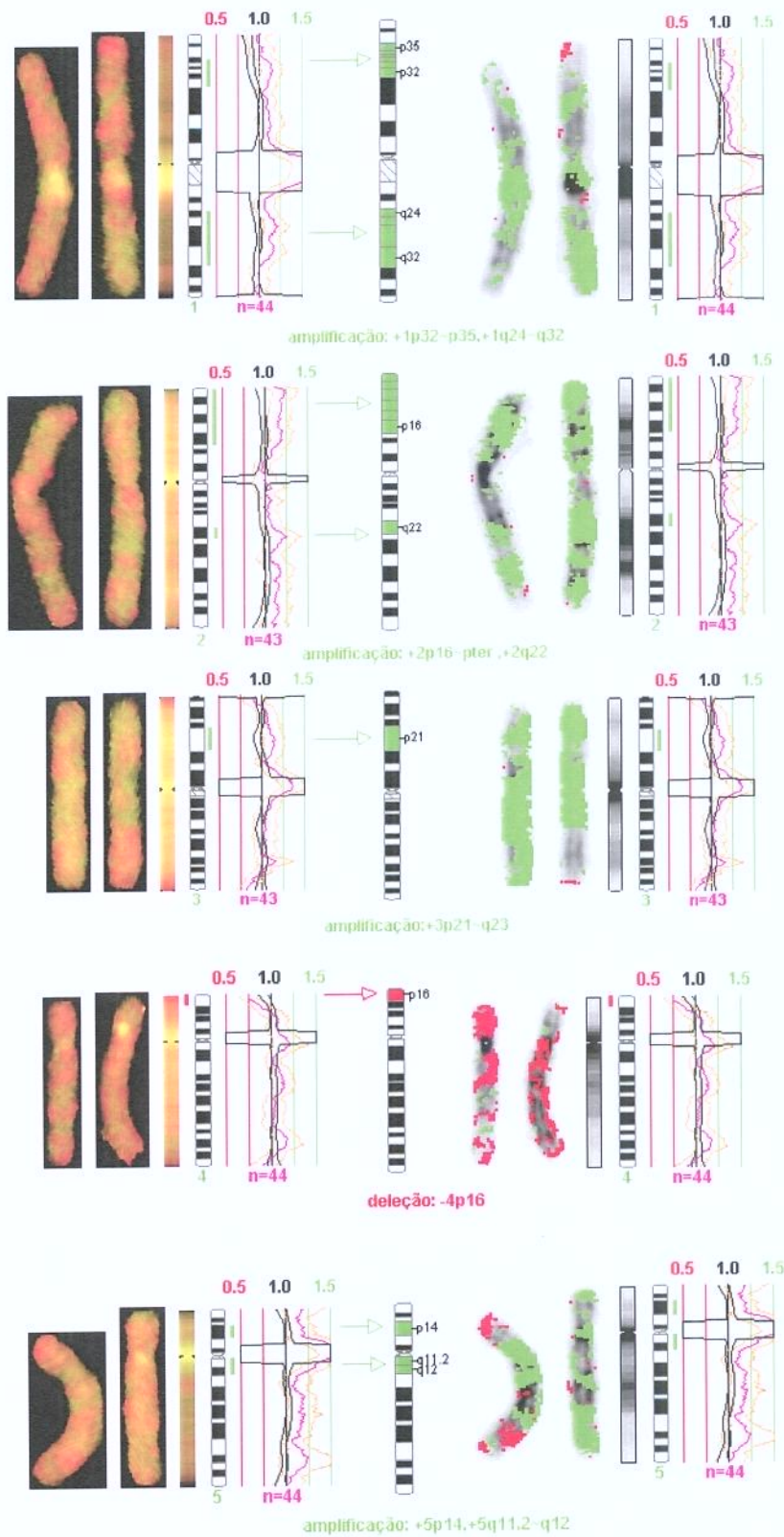


Cariótipo DAPI invertido

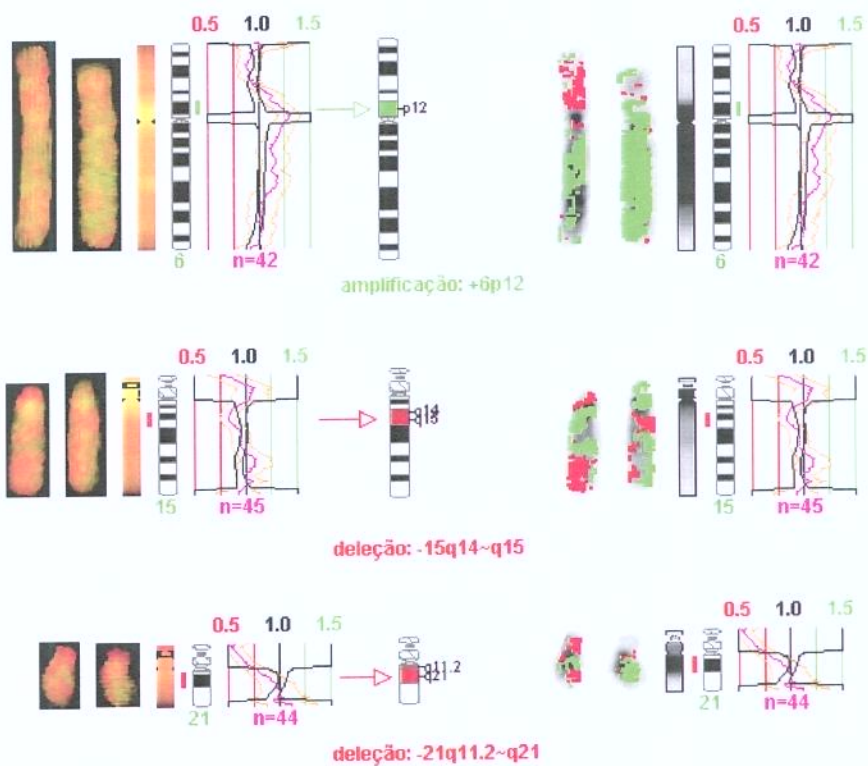


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

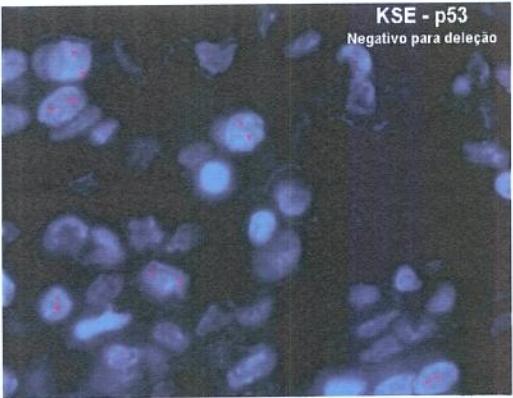
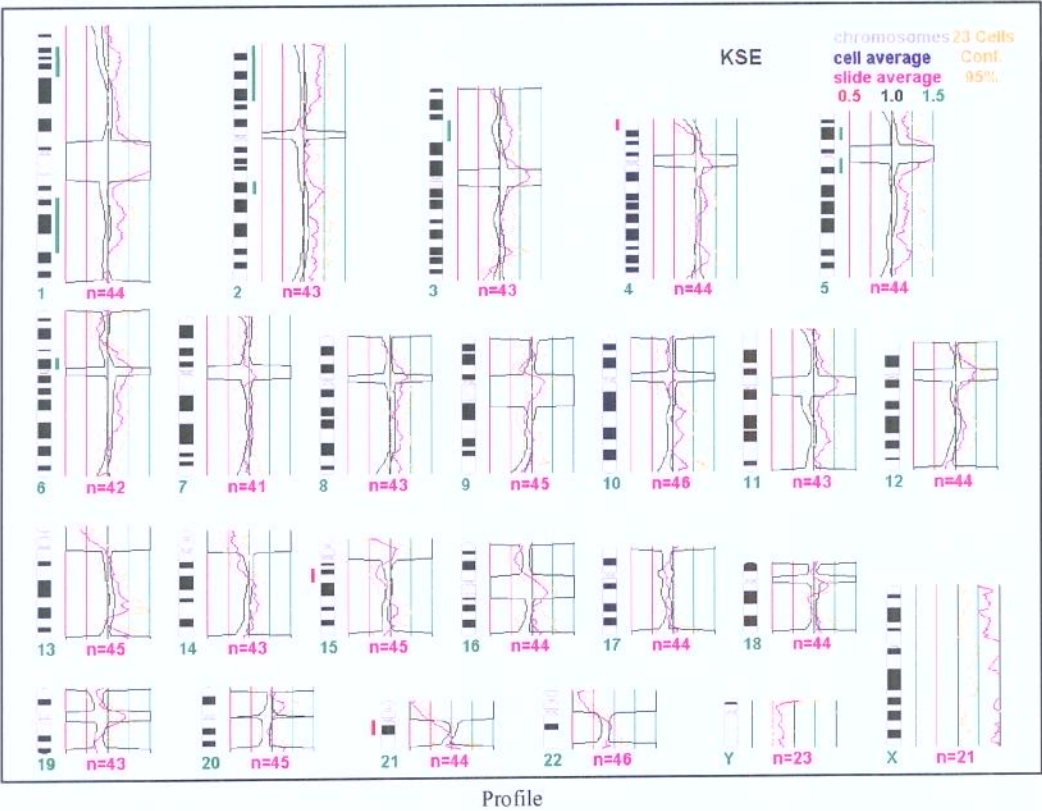
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



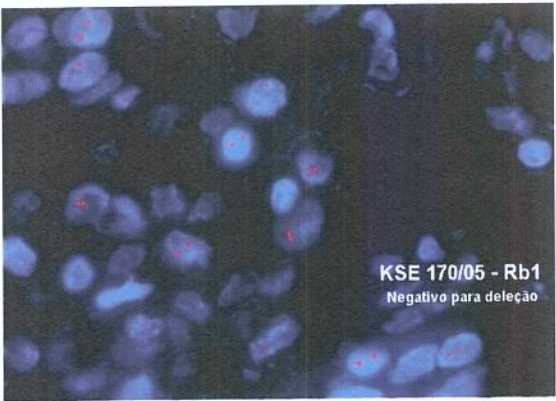
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 20: KSE



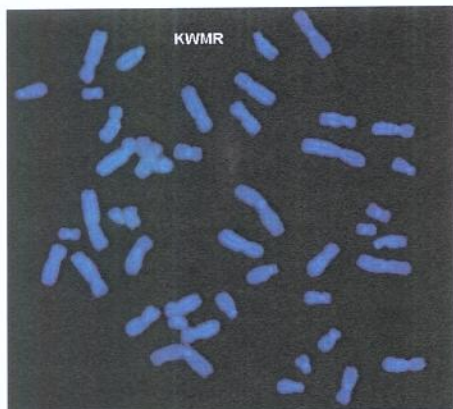
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



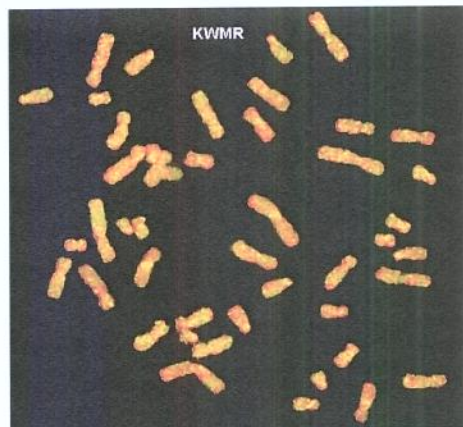
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 21: KWMR

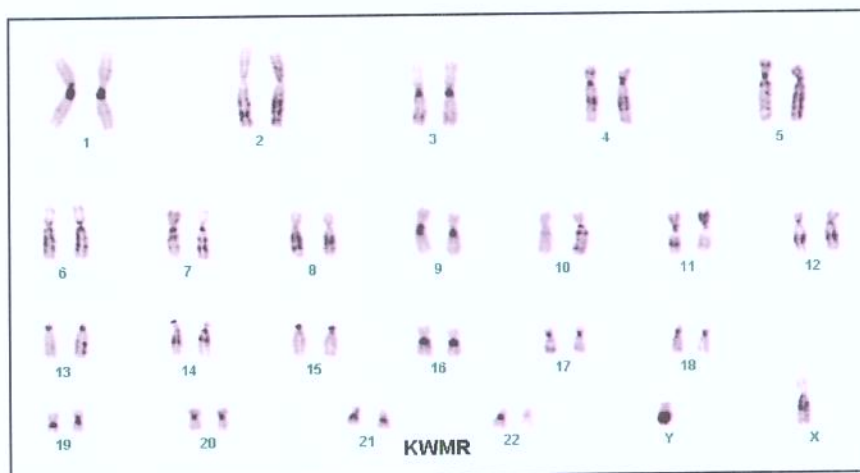
Resultado: +1p25~p31,+2p24~pter,+2q12~q13,+4q31.1~q31.2,+5q31~q34,+6p11.2~p21.3,
+8q21.3~q23,+10q22~qter,+13q31~q32



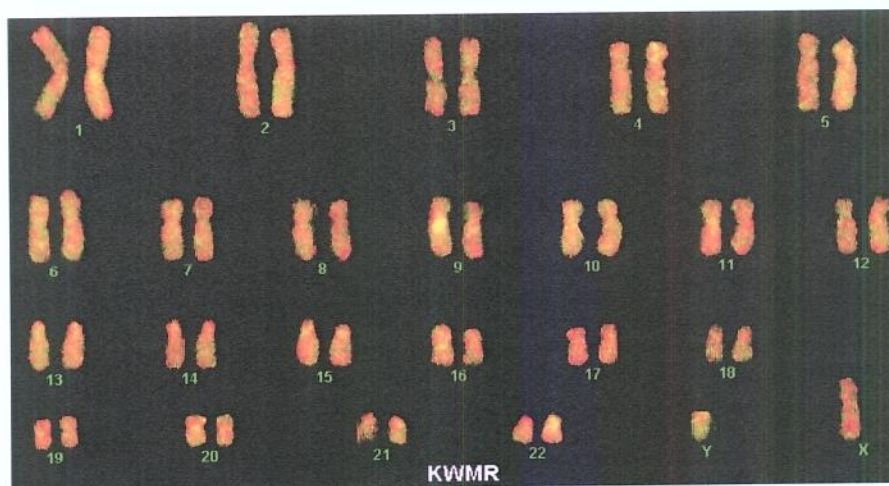
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

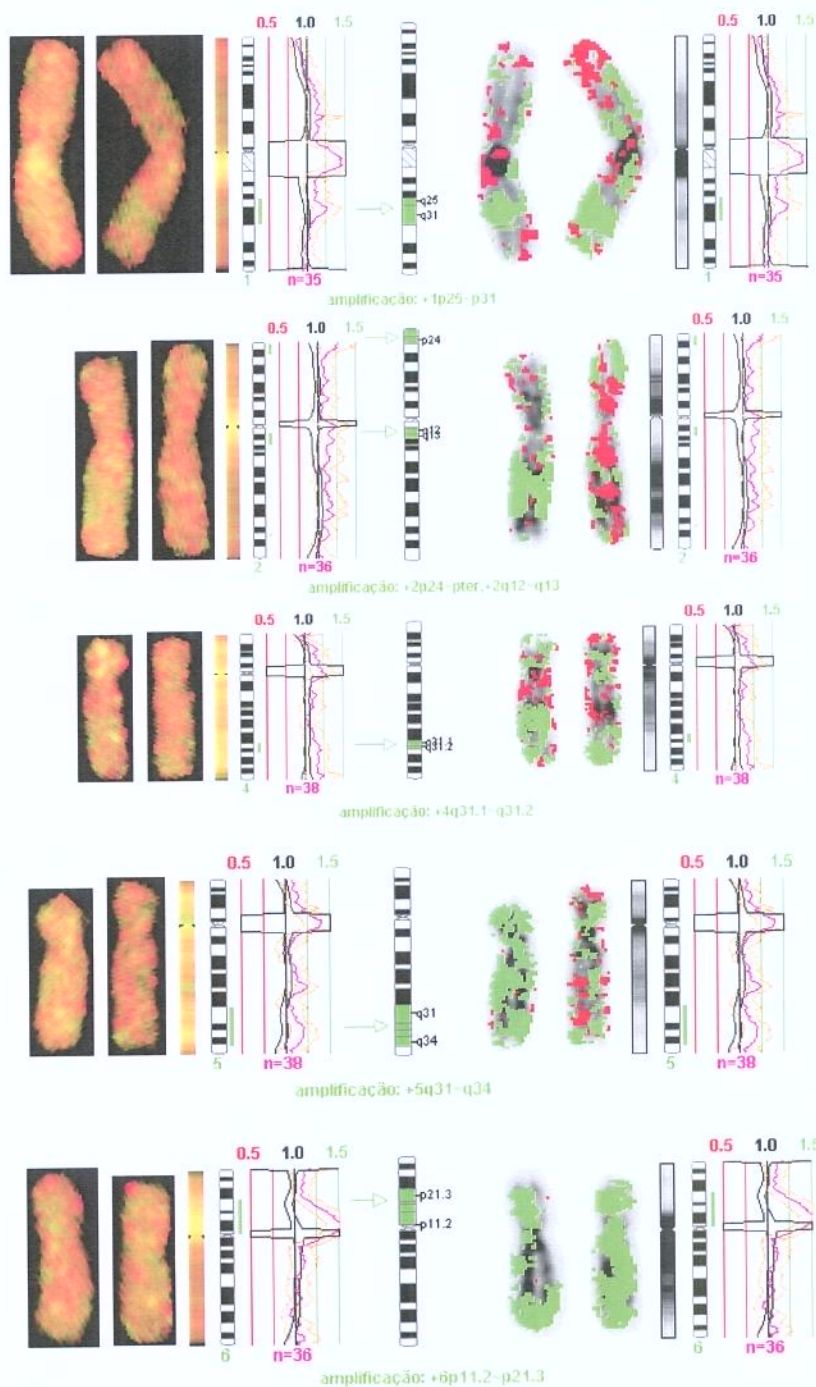


Cariótipo DAPI invertido



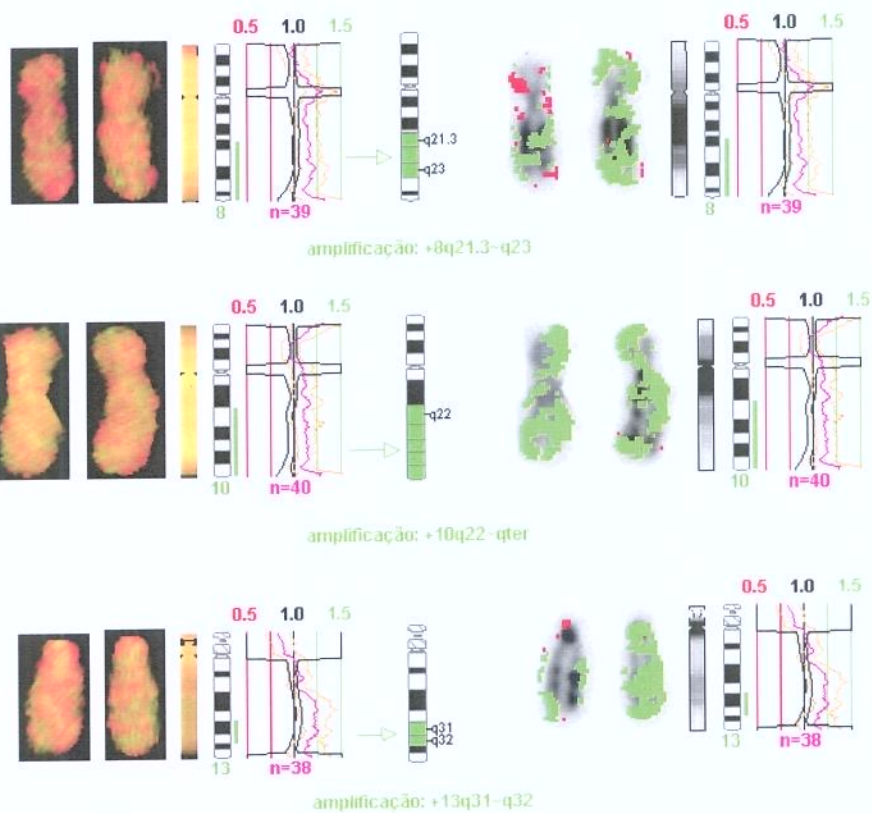
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

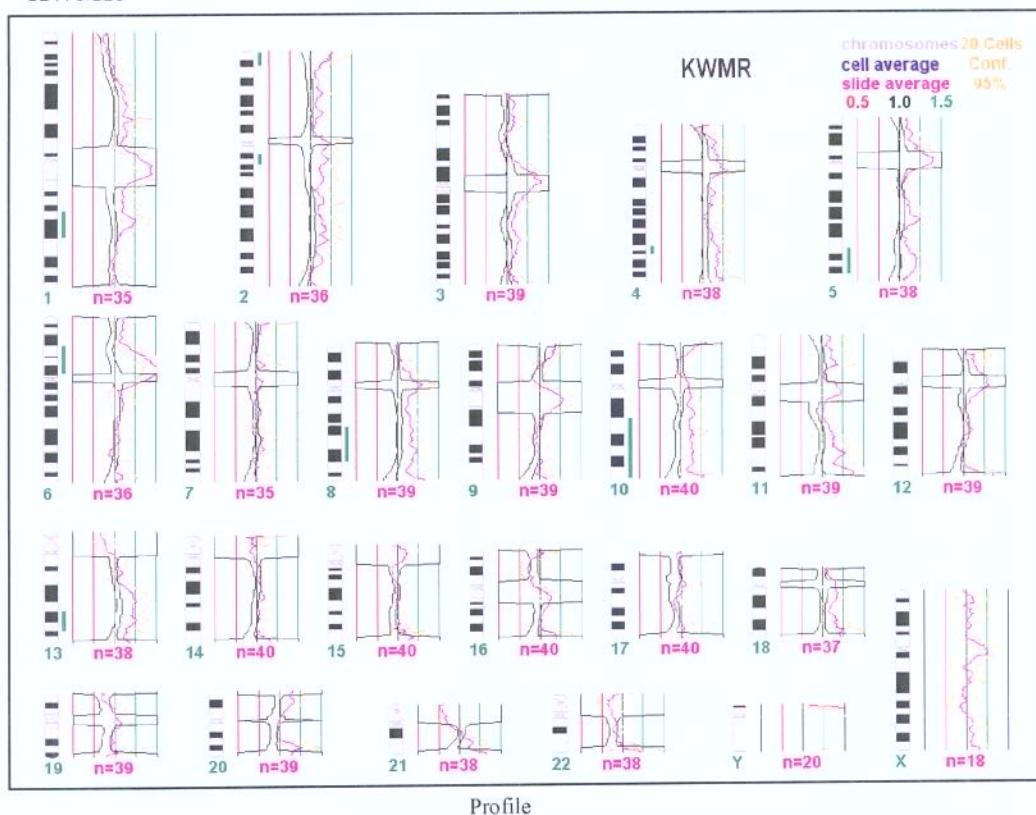


Caso 21: KWMR

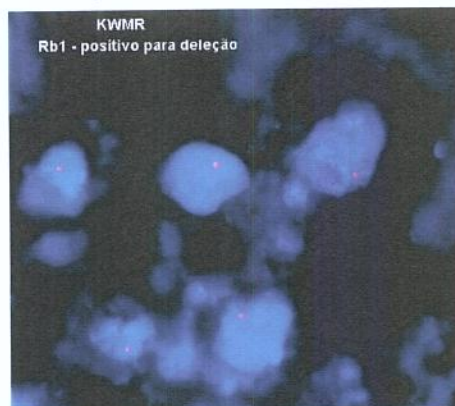
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 21: KWMR



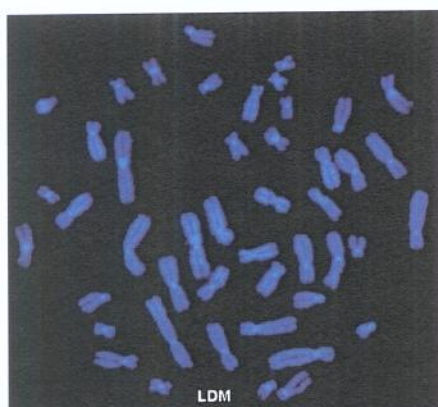
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



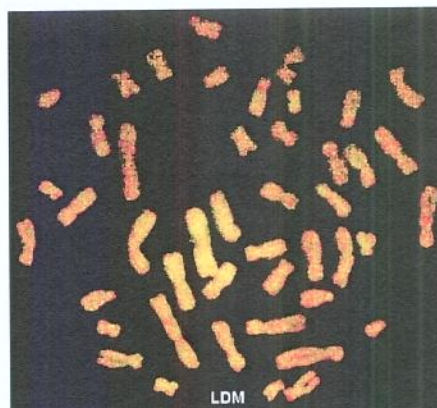
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 22: LDM

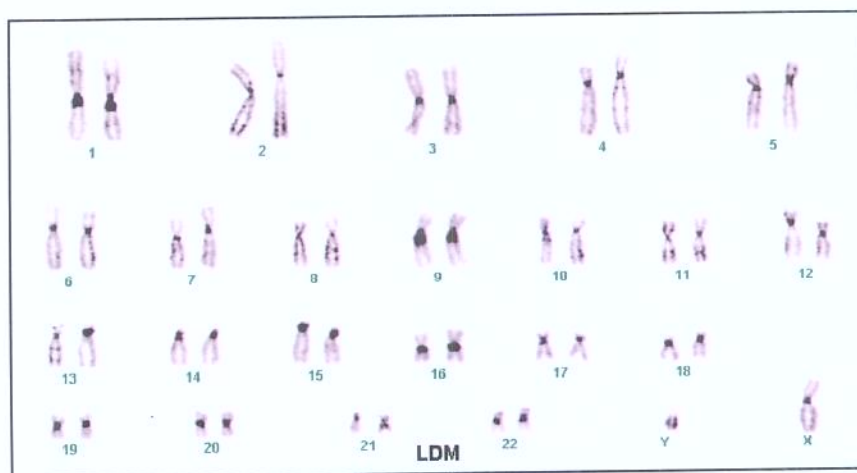
Resultado: +1q25~q31,-9q21,+18q11.2~q21,-21q11.2~q21



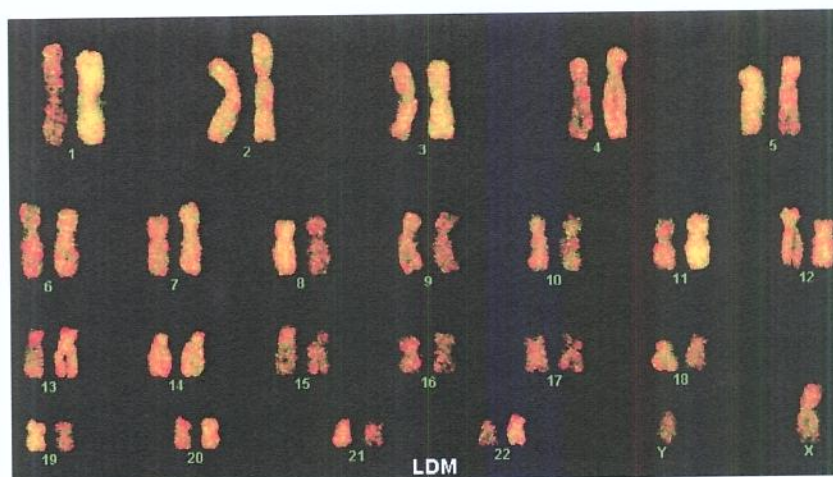
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

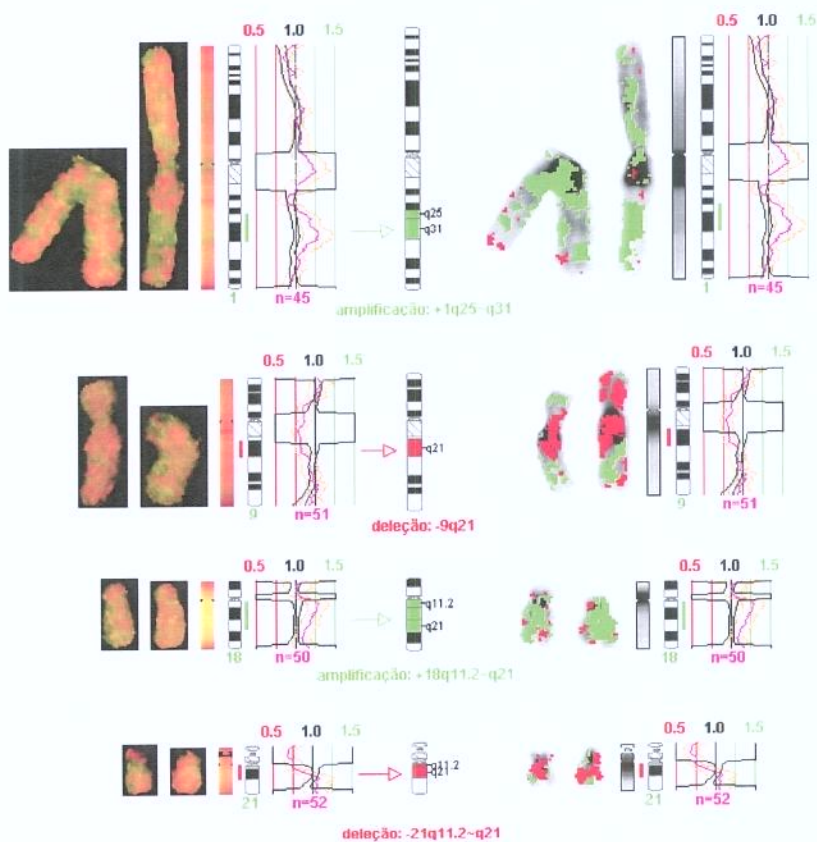


Cariótipo DAPI invertido

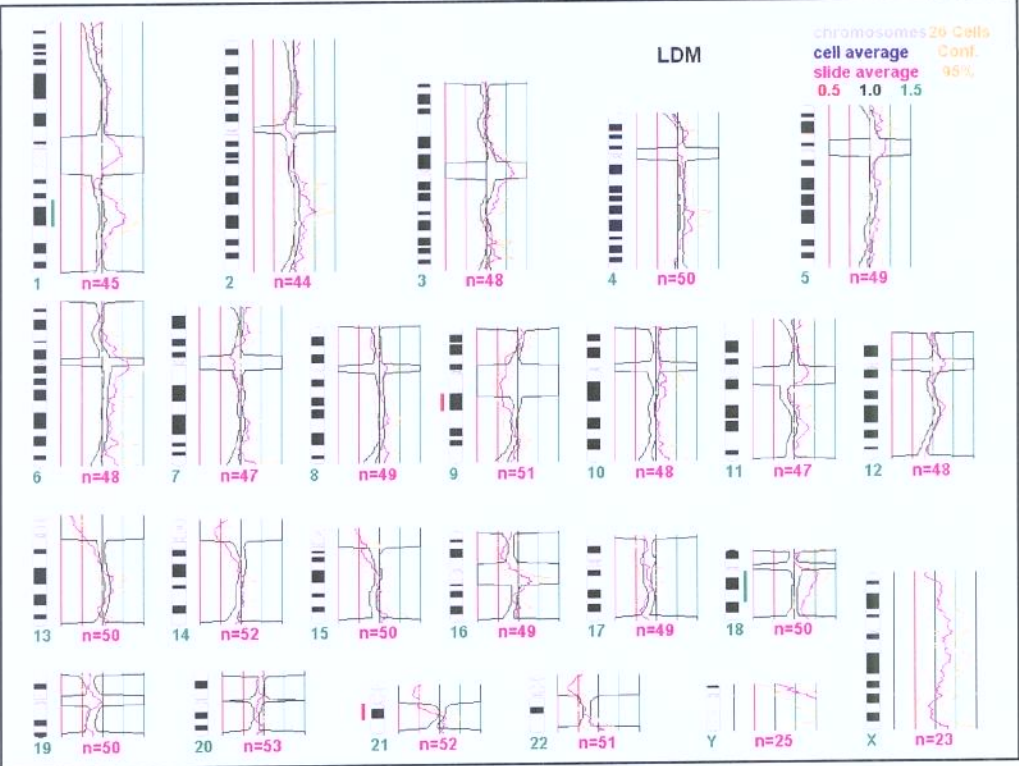


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



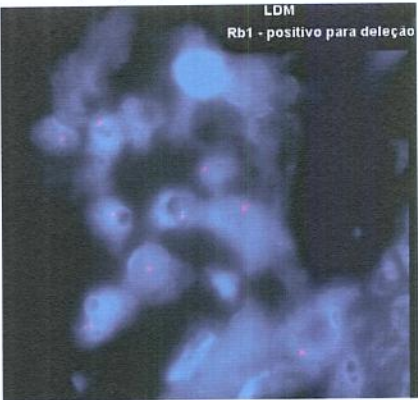
Caso 22: LDM



Profile



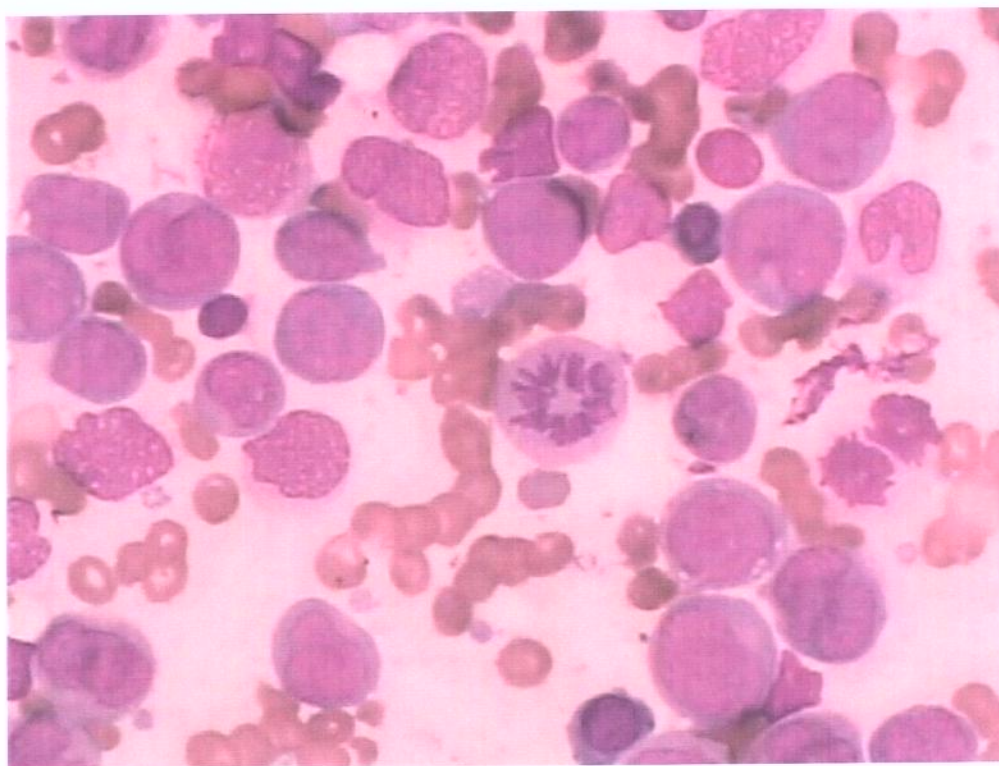
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



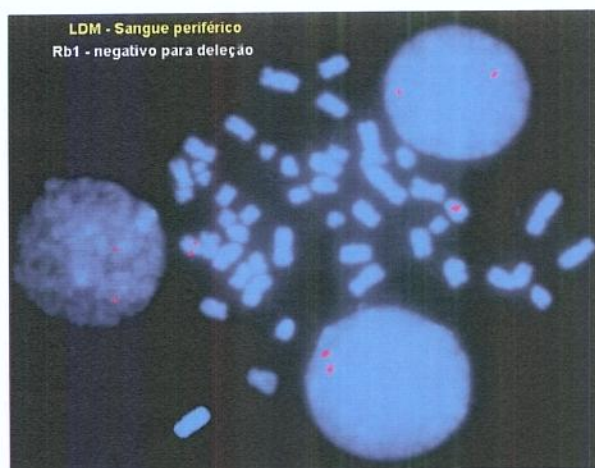
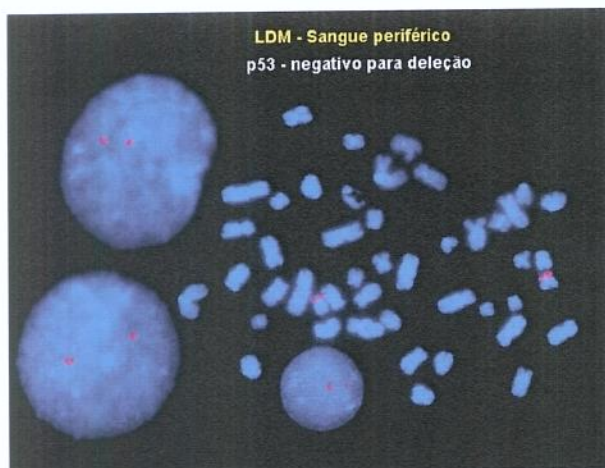
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 22: LDM

Mielograma da 2ª neoplasia (LMA)



Mielograma da 2ª neoplasia (LMA)

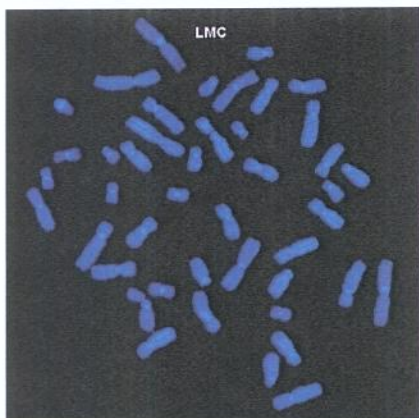


FISH para pesquisa da deleção do gene p53 no sangue periférico

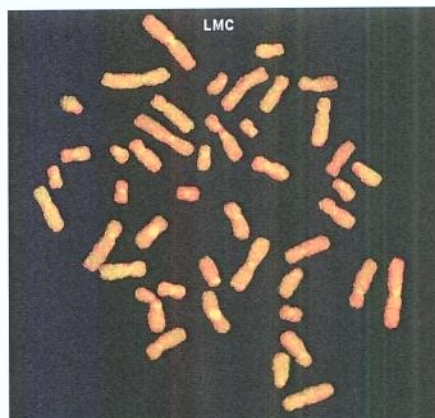
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1 no sangue periférico

Caso 23: LMC

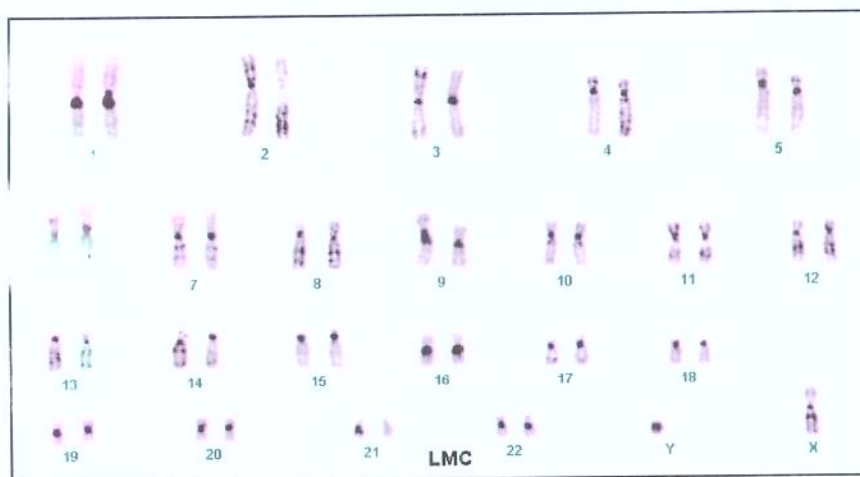
Resultado: +1p13,+2p23~p24,+2q33~qter,+5p14~q11.2,+6p12~p21.3,+8q21.3~qter,
+11p15~q13,+12p12,+16q12.2~q13,+18p11.2~q23,-21q11.2~q21



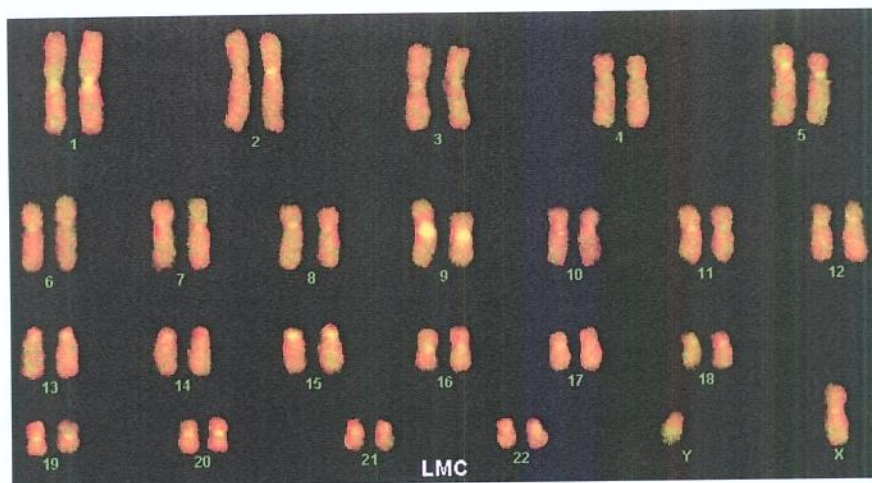
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

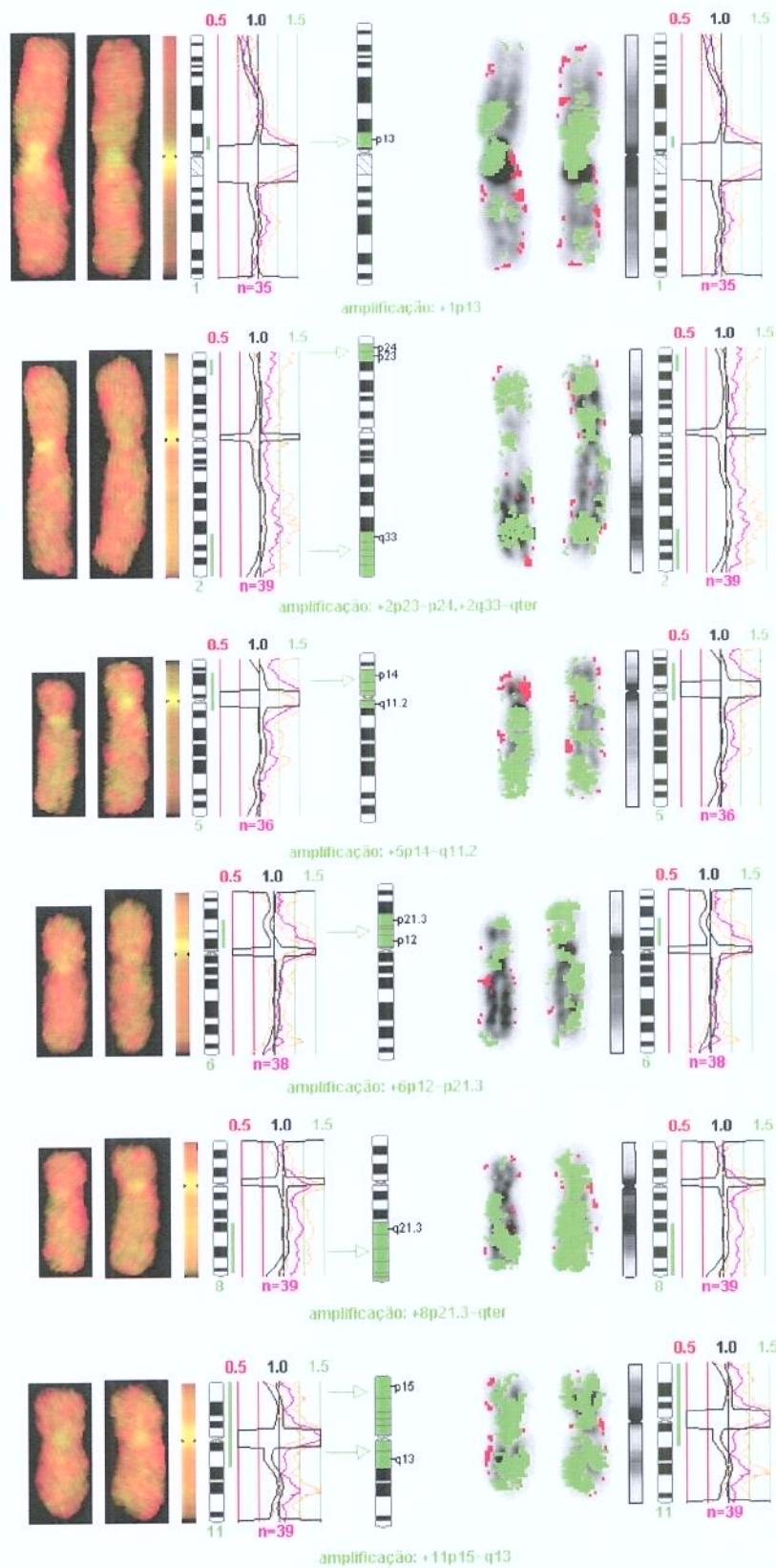


Cariótipo DAPI invertido



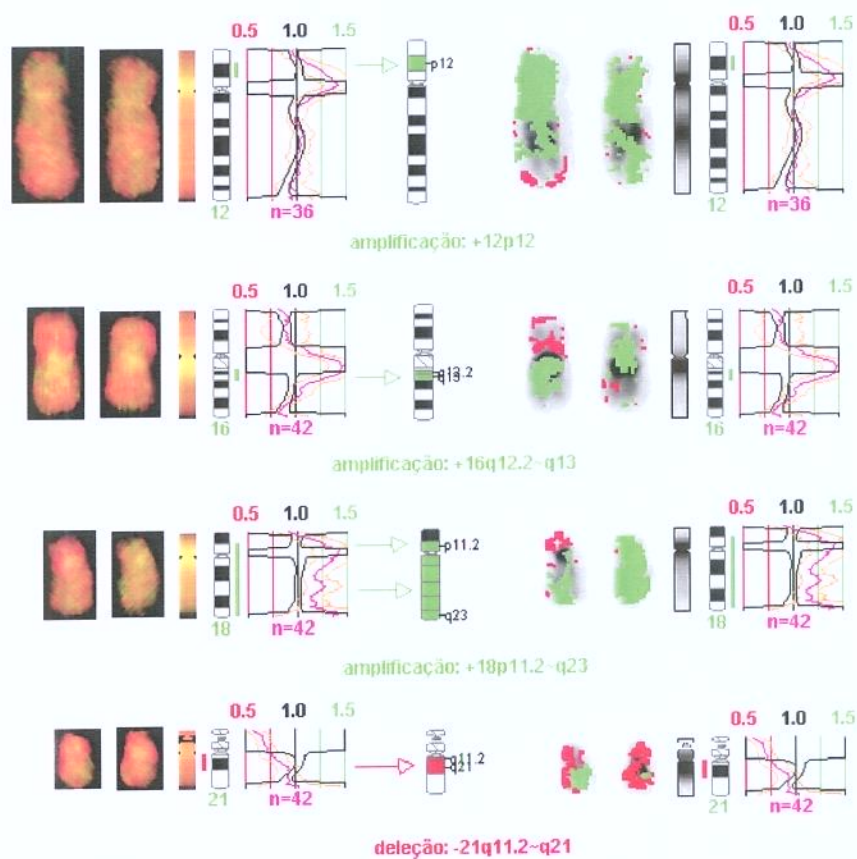
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

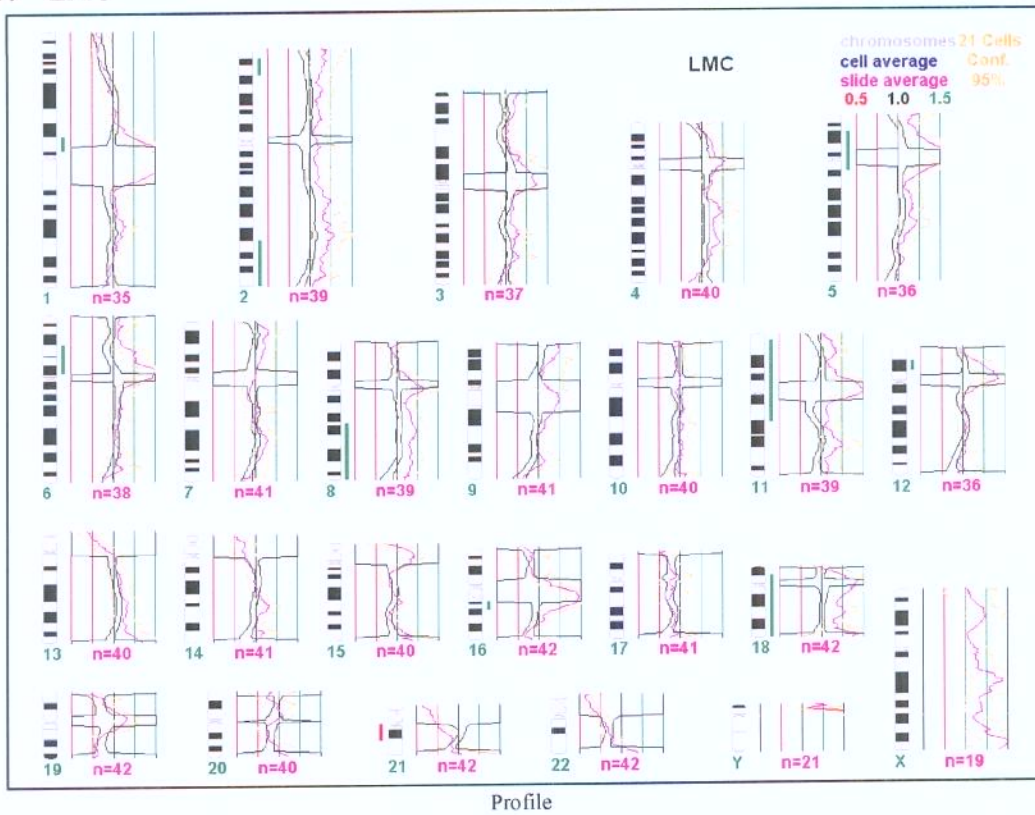


Caso 23: LMC

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 23: LMC



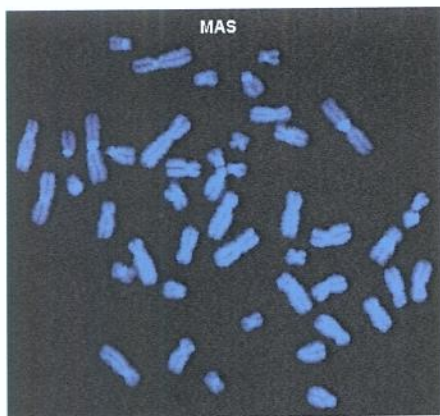
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



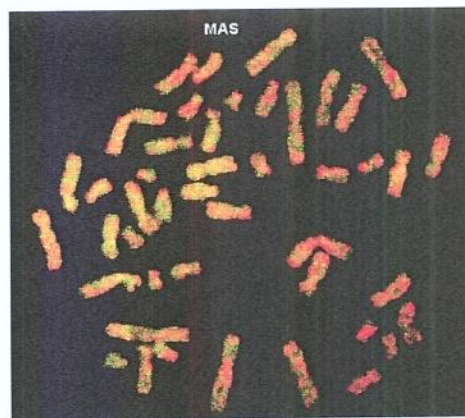
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 24: MAS

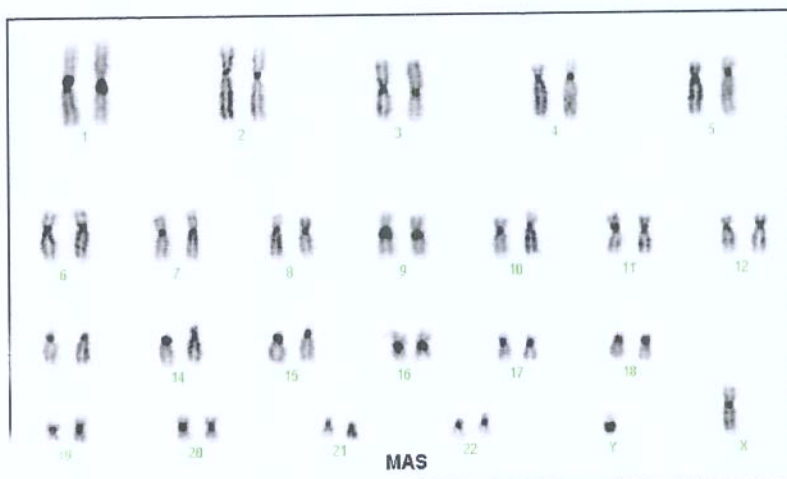
Resultado: +1p22 ~ p31,+1q31, -2p12, +2q33, +3q13.1, +4p15.1 ~ p15.2,+5q15 ~ q31, +6p11.2~p21.3,+7p14,+9q22~qter,+10q22~q23,+11p15~q13,+13q22~q32,-15q13~q14,-16p13.1



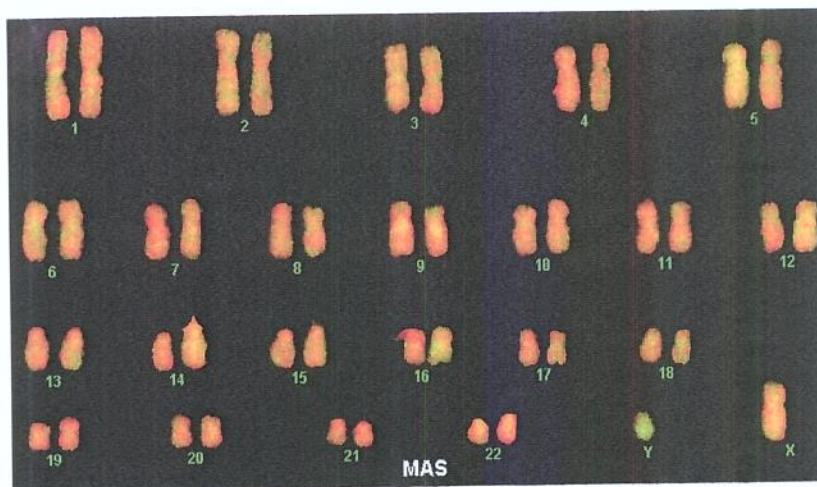
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

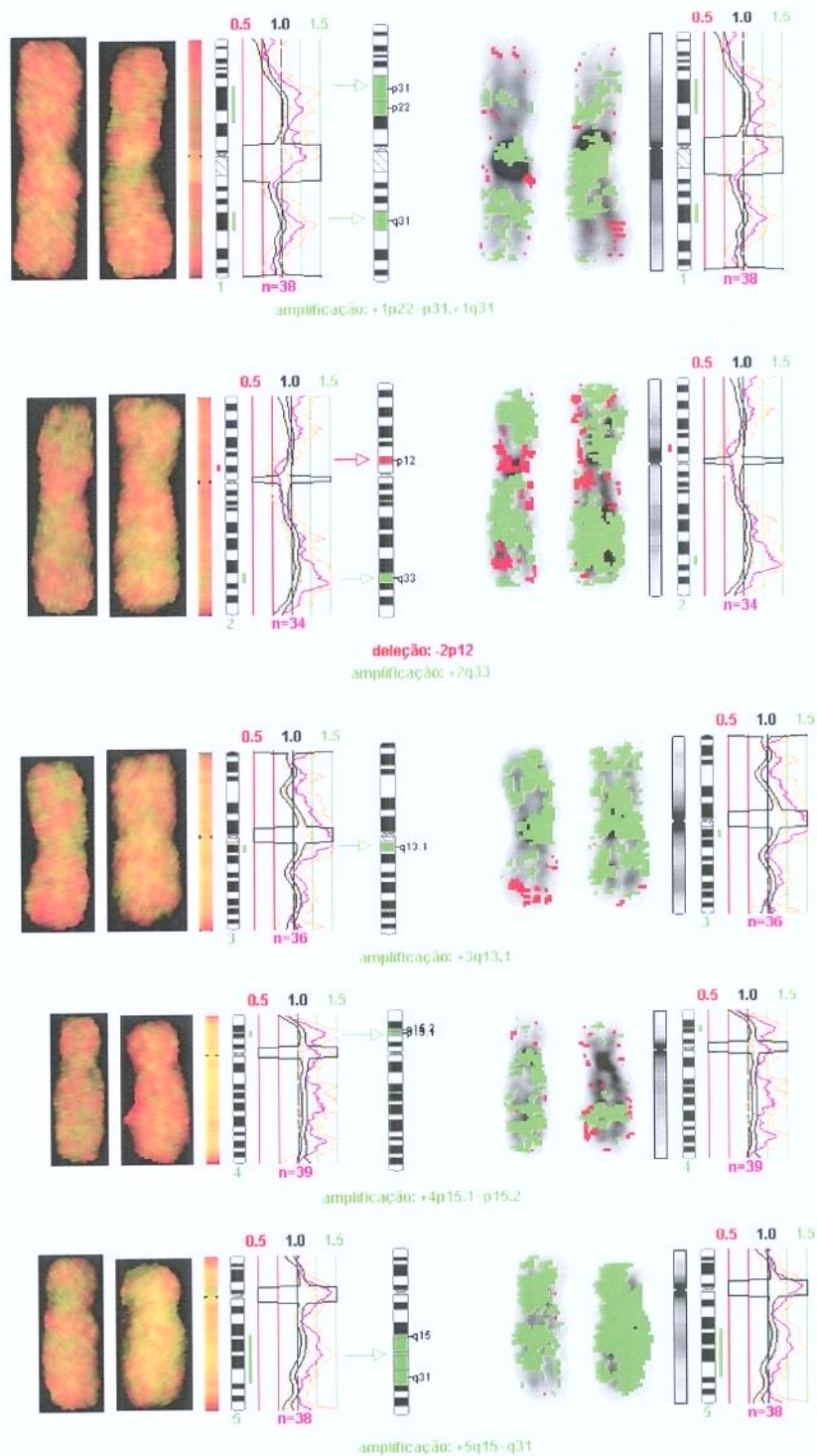


Cariótipo DAPI invertido

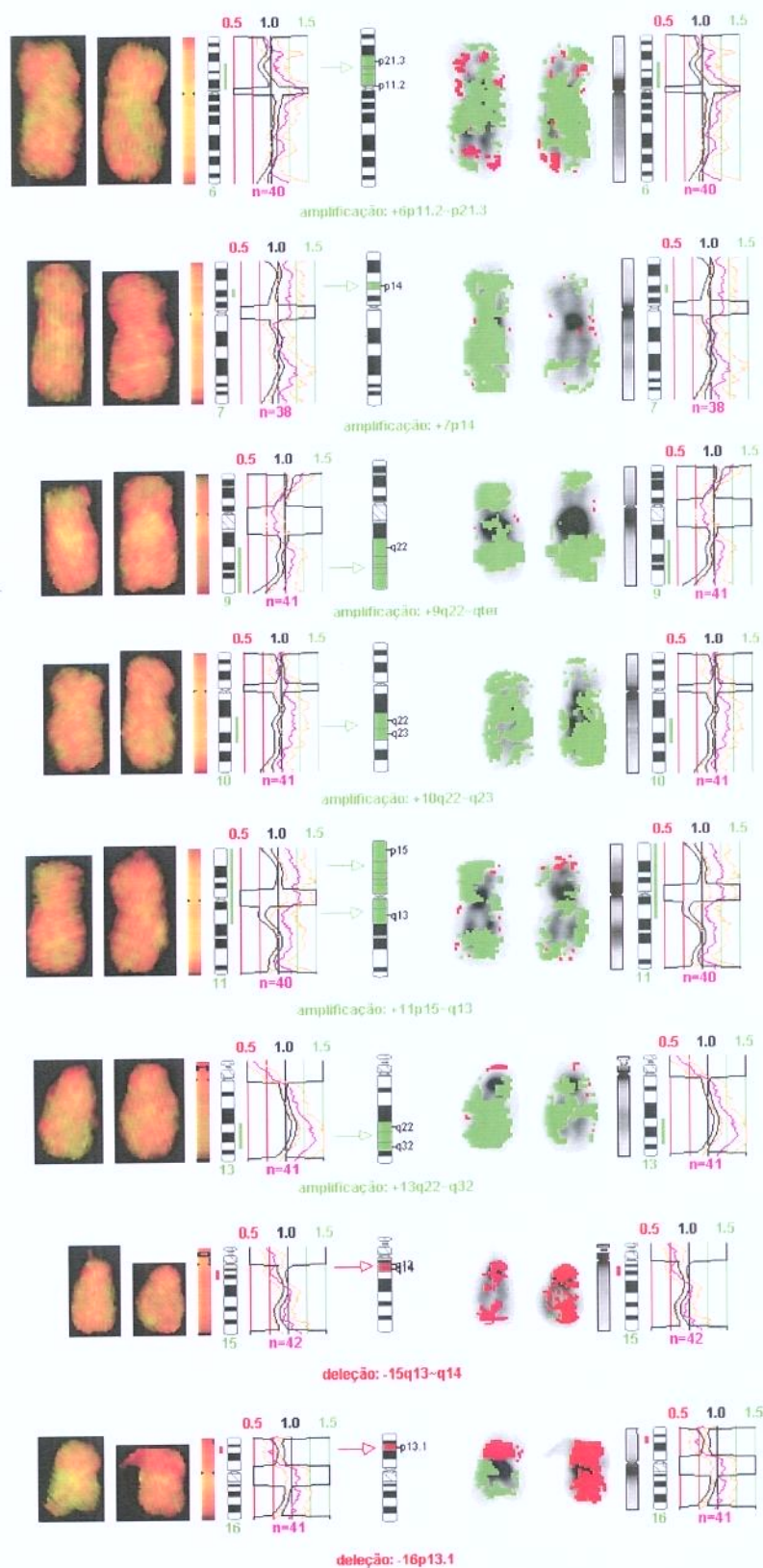


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

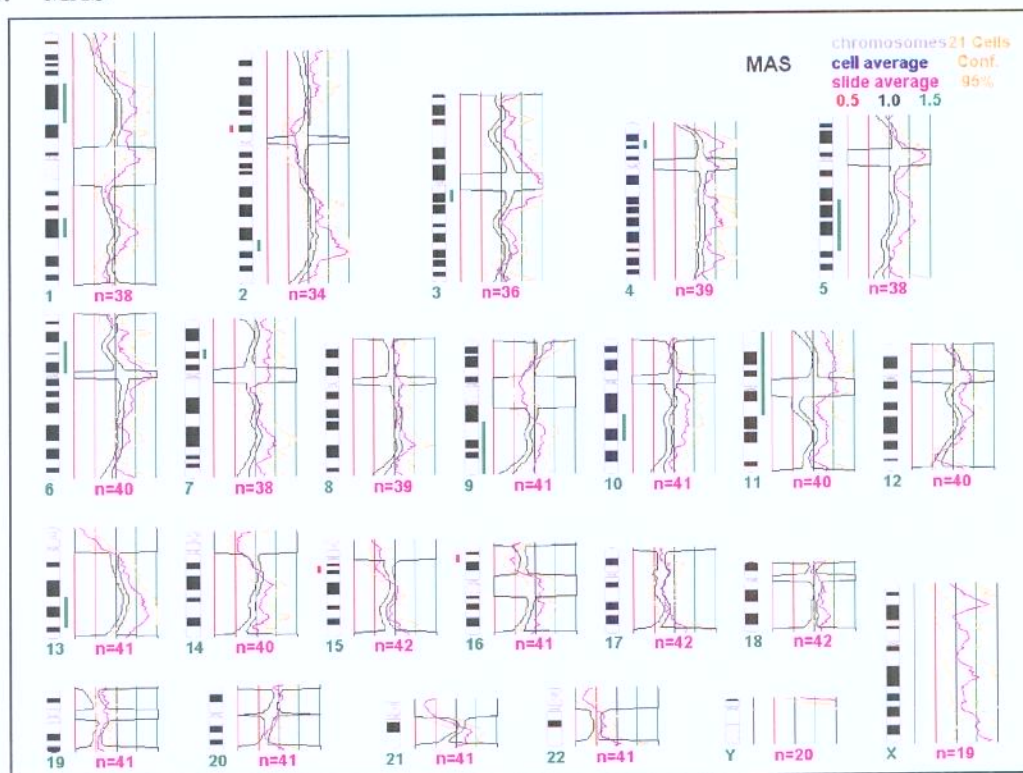
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



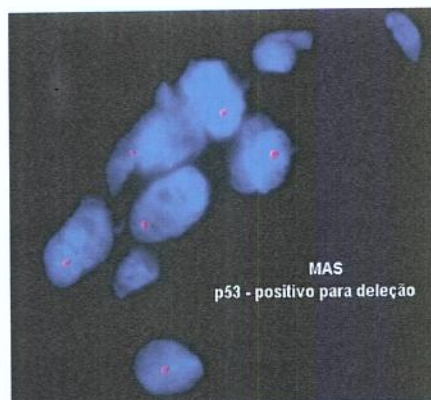
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



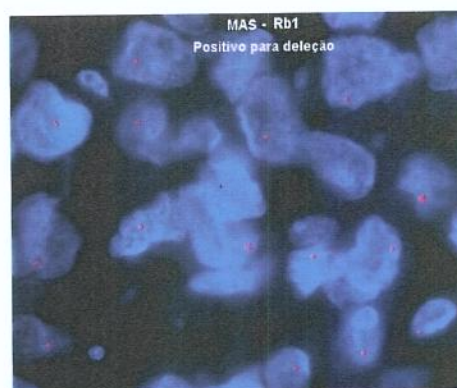
Caso 24: MAS



Profile



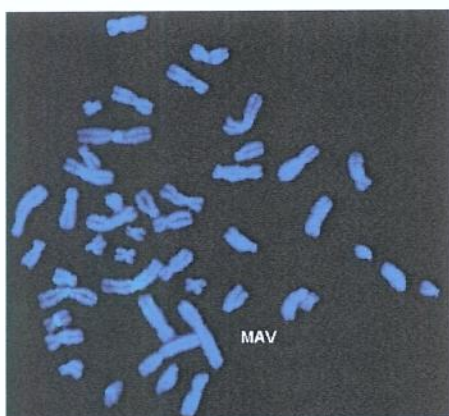
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



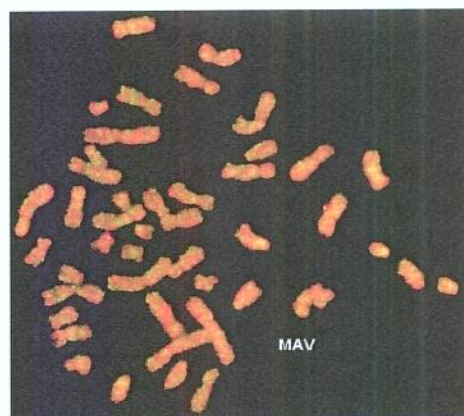
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 25: MAV

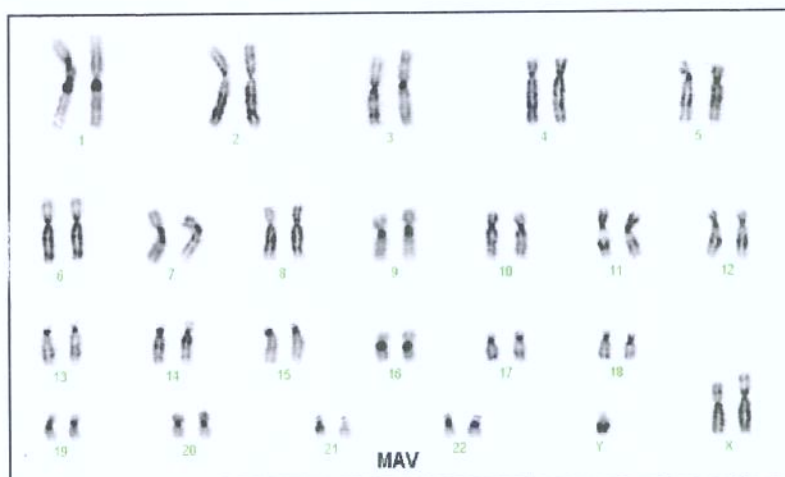
Resultado: +7q31,-14q11.2~q12,-15q14~q15,-16p12p~13.1



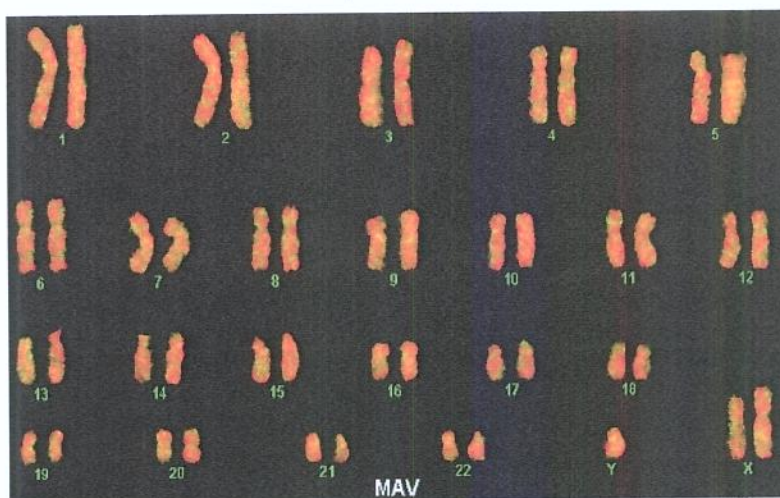
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

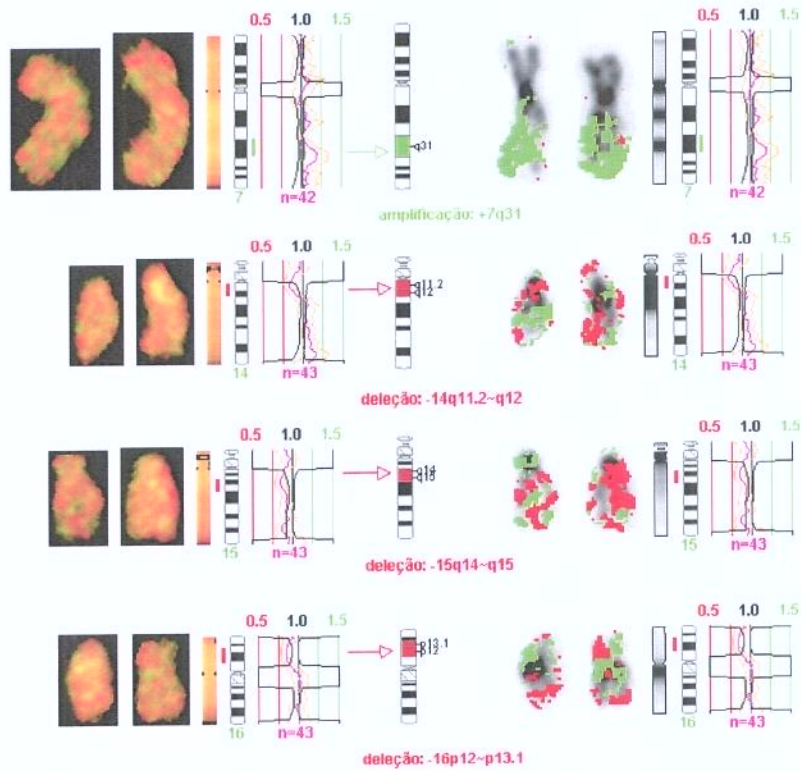


Cariótipo DAPI invertido

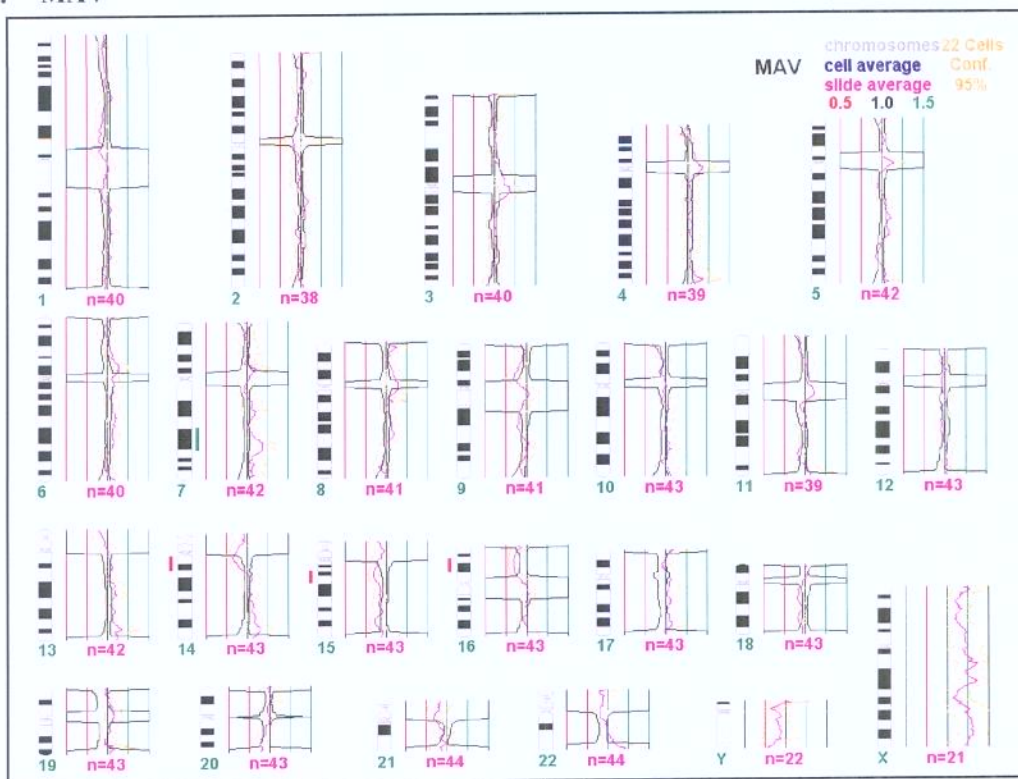


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

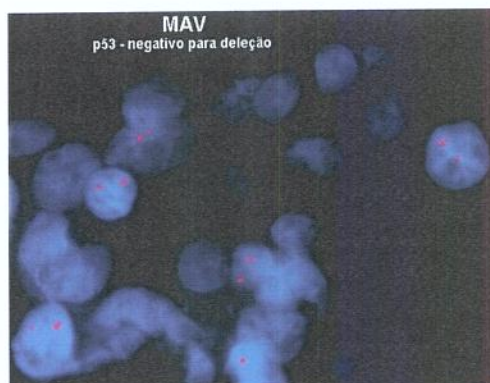
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 25: MAV



Profile



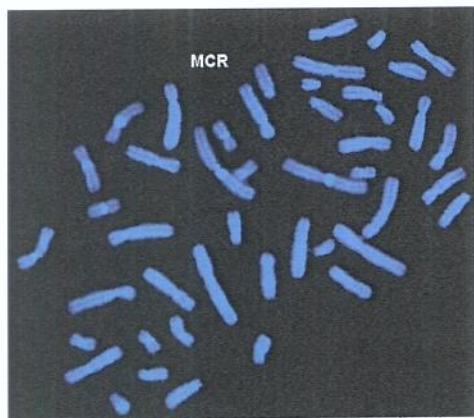
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



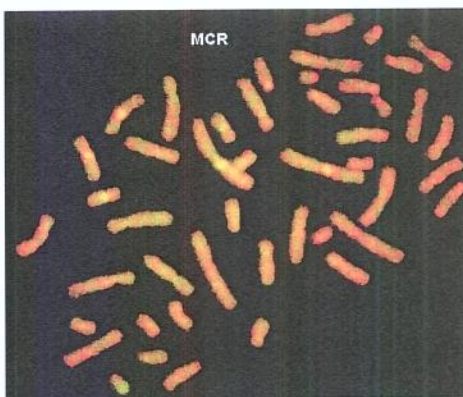
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 26: MCR

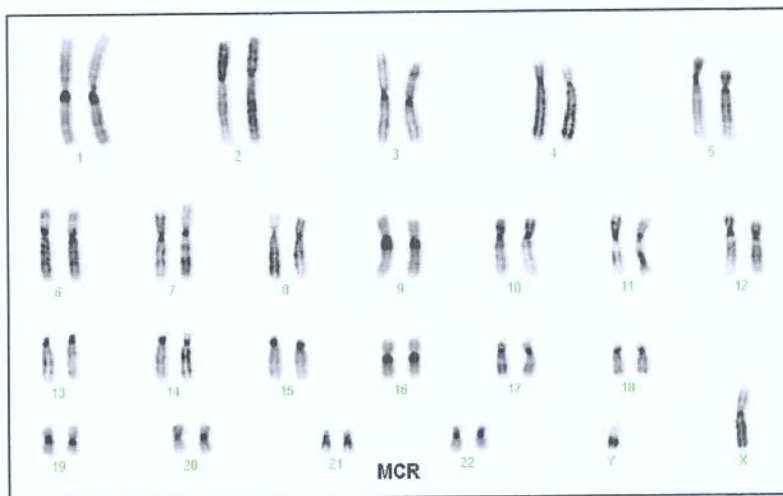
Resultado: +2p13~p33,+1q31,+2p21~pter,+2q22~q31,+5p14~q34,+6q14~q21,+7q31,+8p22,+8q22~q24.1,+11q22~q23,+13q21~qter,+15q21~q24,-16p12~pter,+16q,+18q,-21q11.2~q21



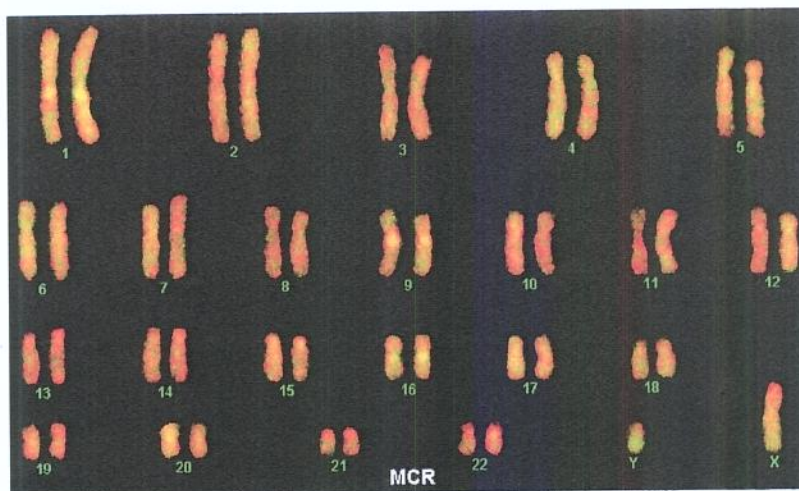
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

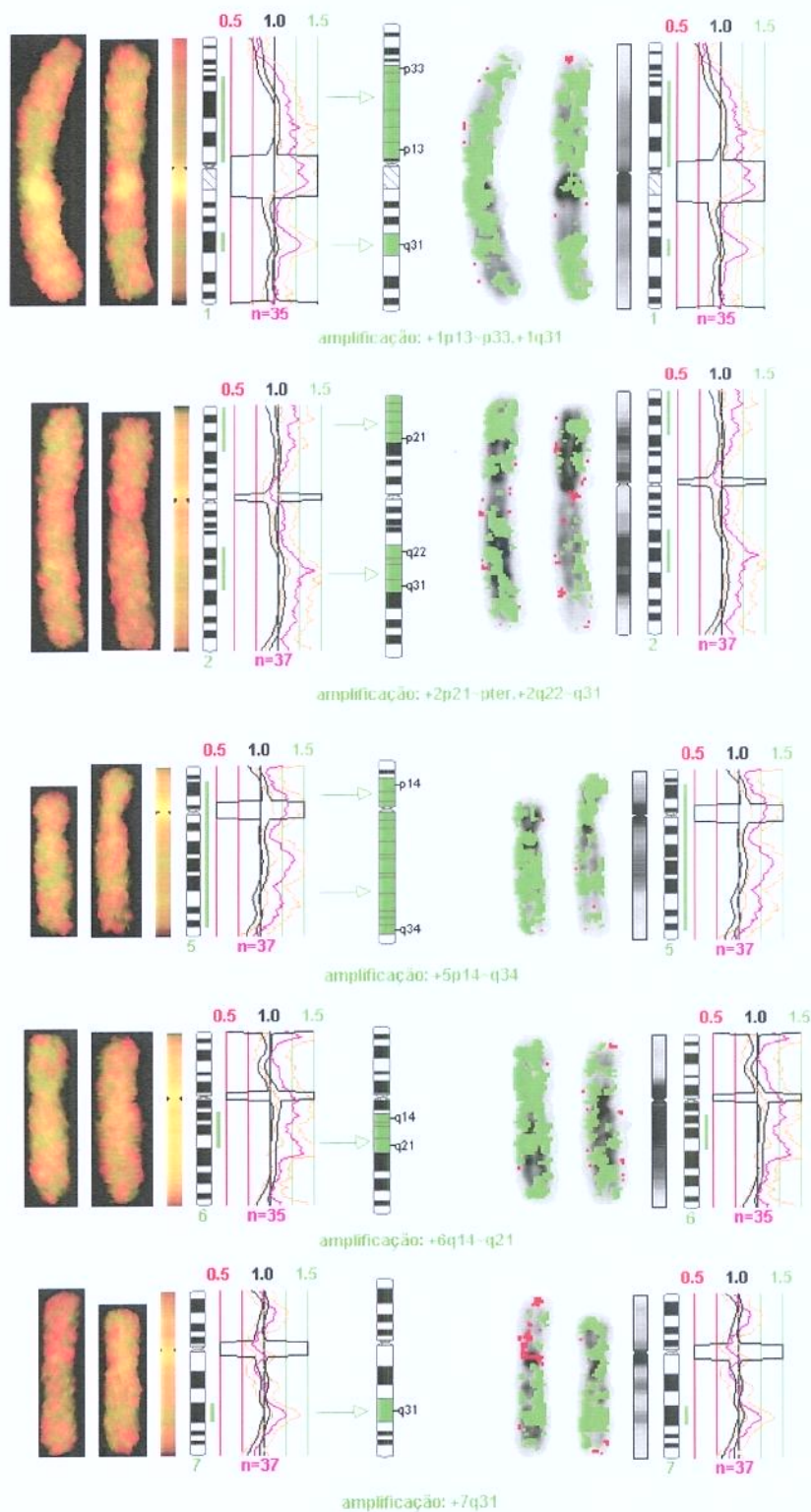


Cariótipo DAPI invertido



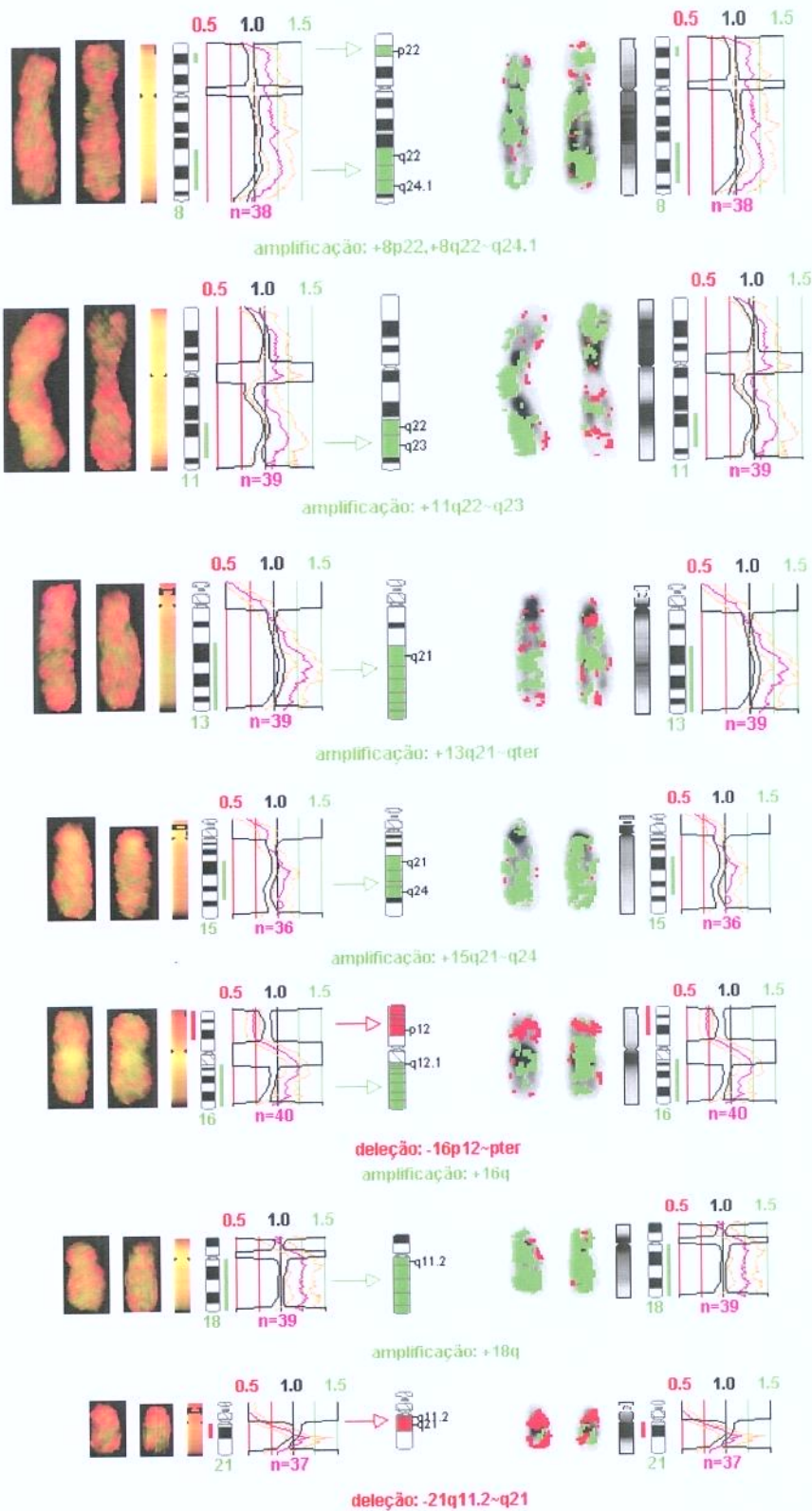
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

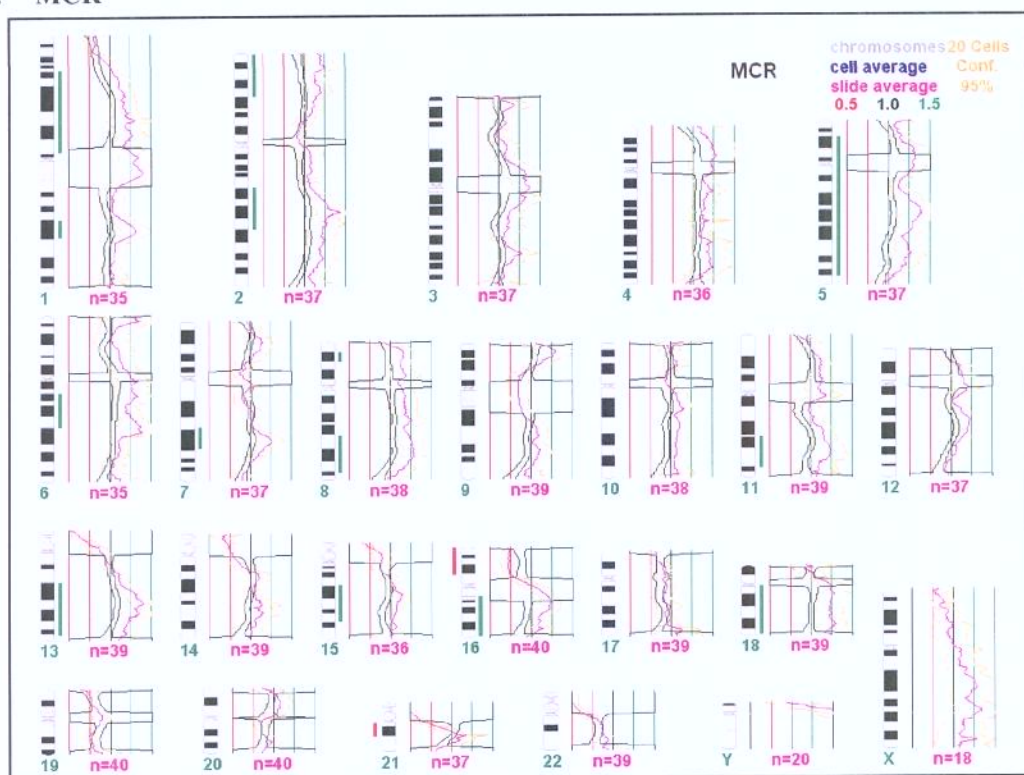


Caso 26: MCR

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 26: MCR



Profile



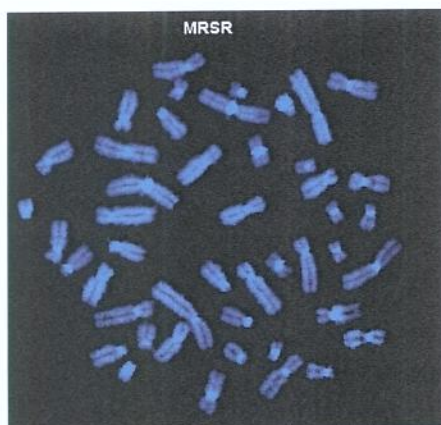
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



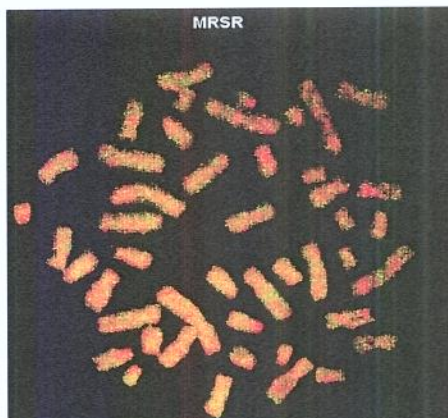
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 27: MRSR

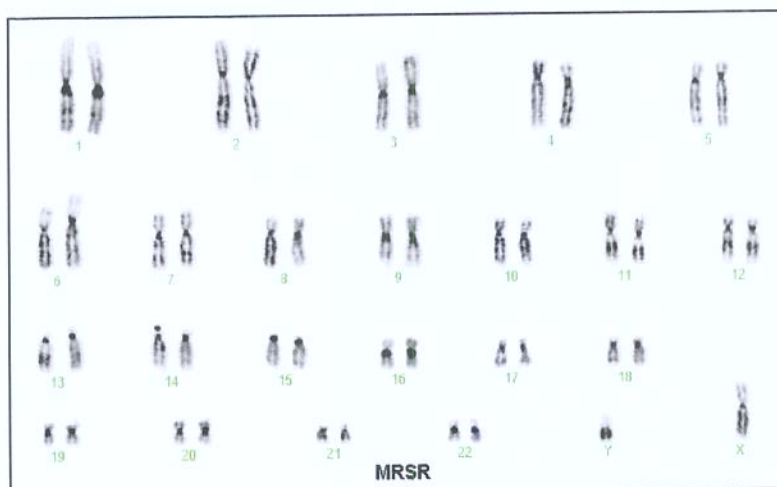
Resultado: +2p24~q36,+4p14,+4q25~q34,+5,+8p11.2~q22,+10q22~qter,+11q14~q22,+12q12,+12q24.3,+14q21~q23,-16p12~p13.1,+17p13~q21,+18q11.2,+19q



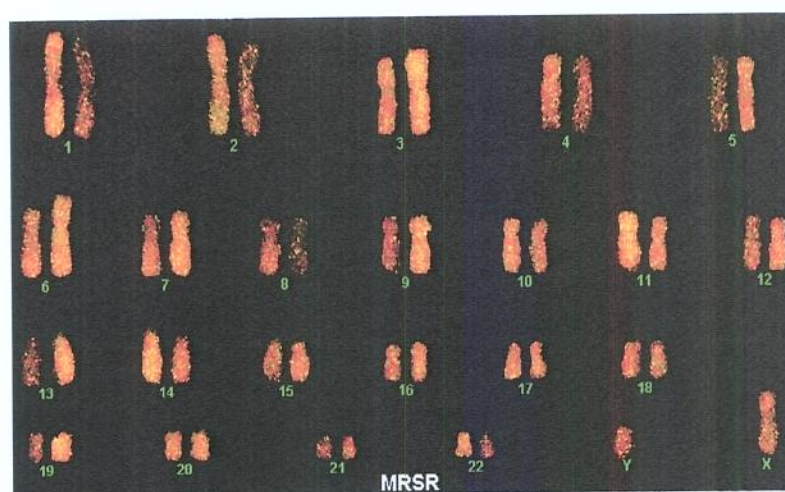
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

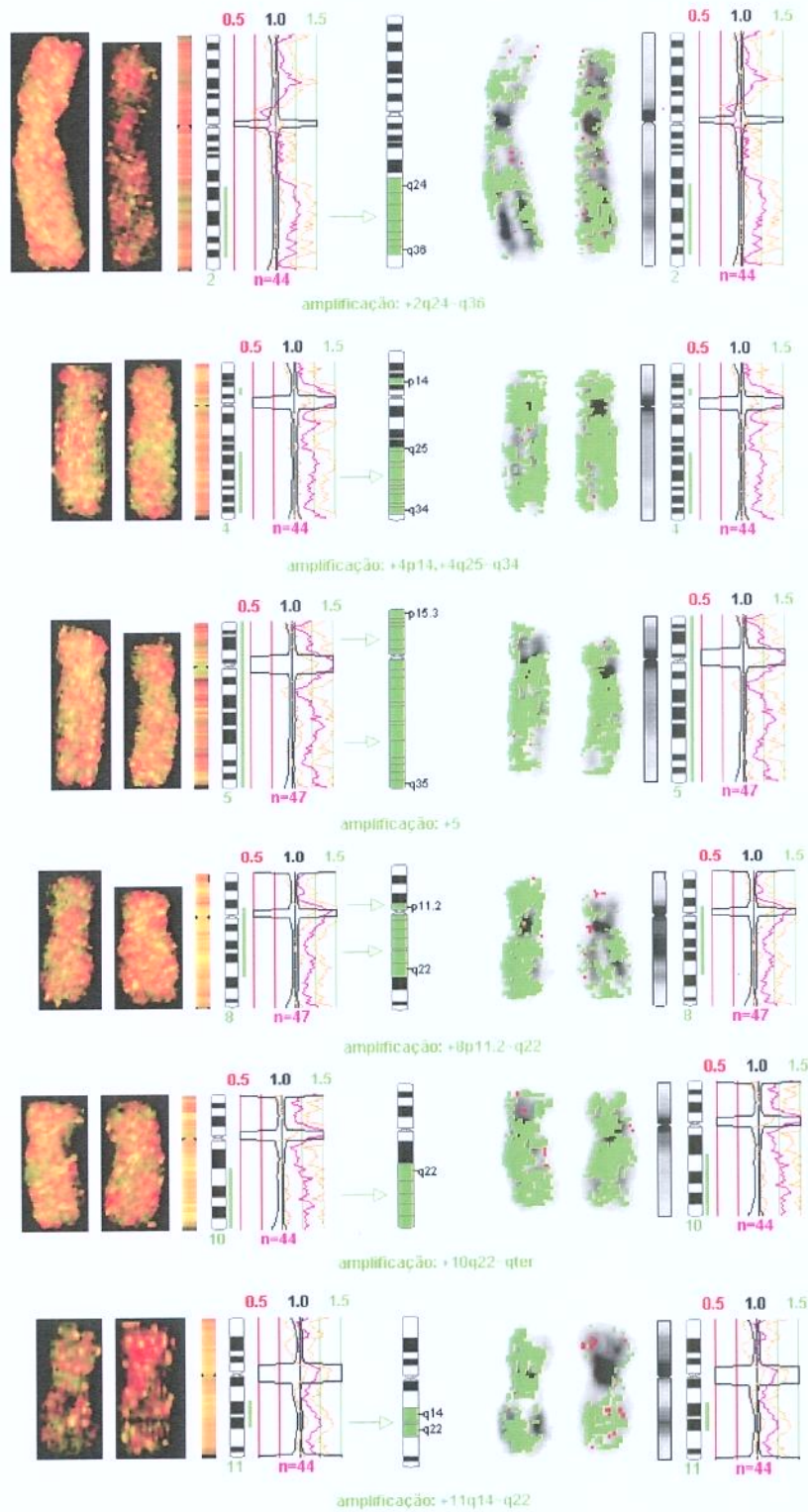


Cariótipo DAPI invertido



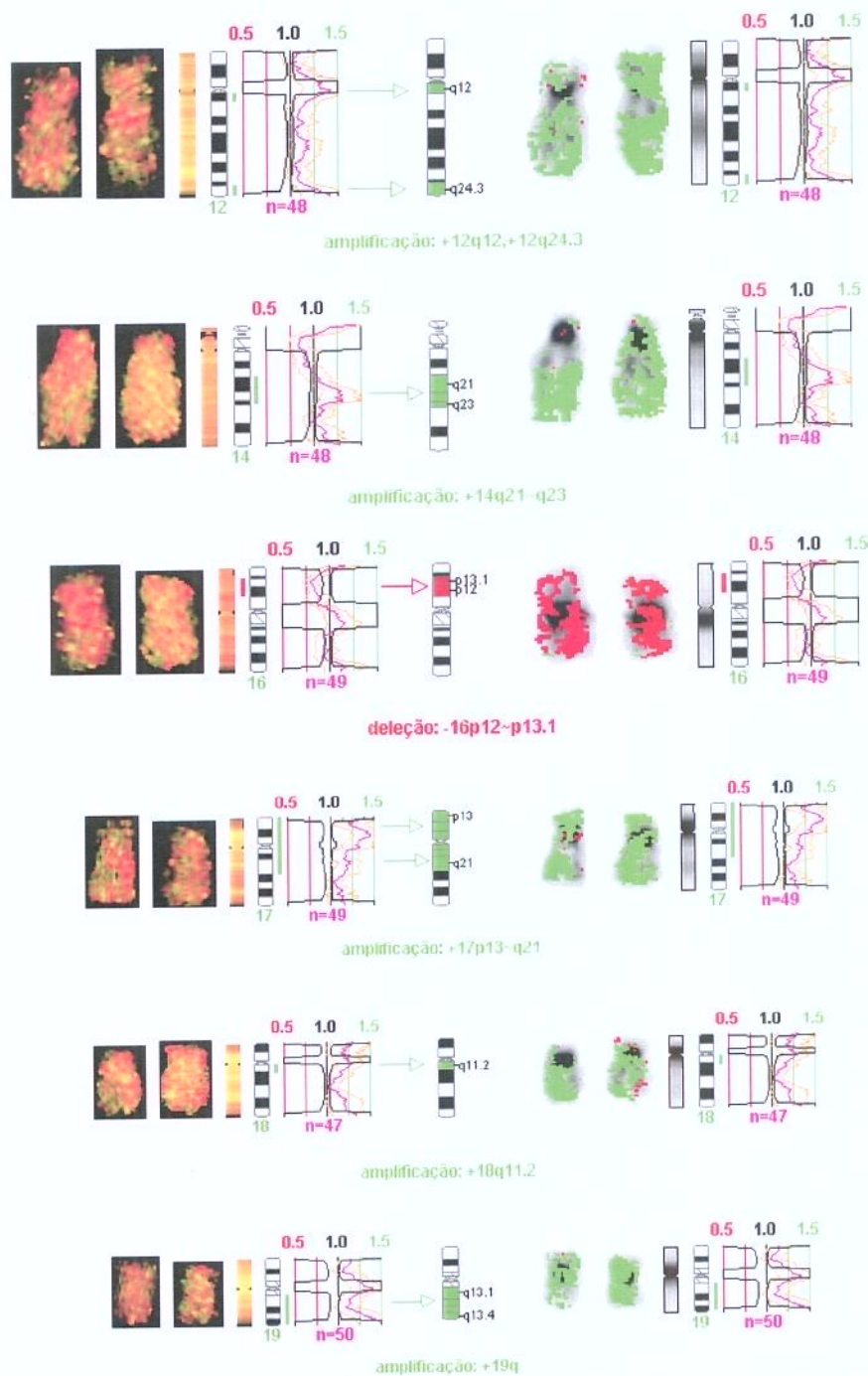
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

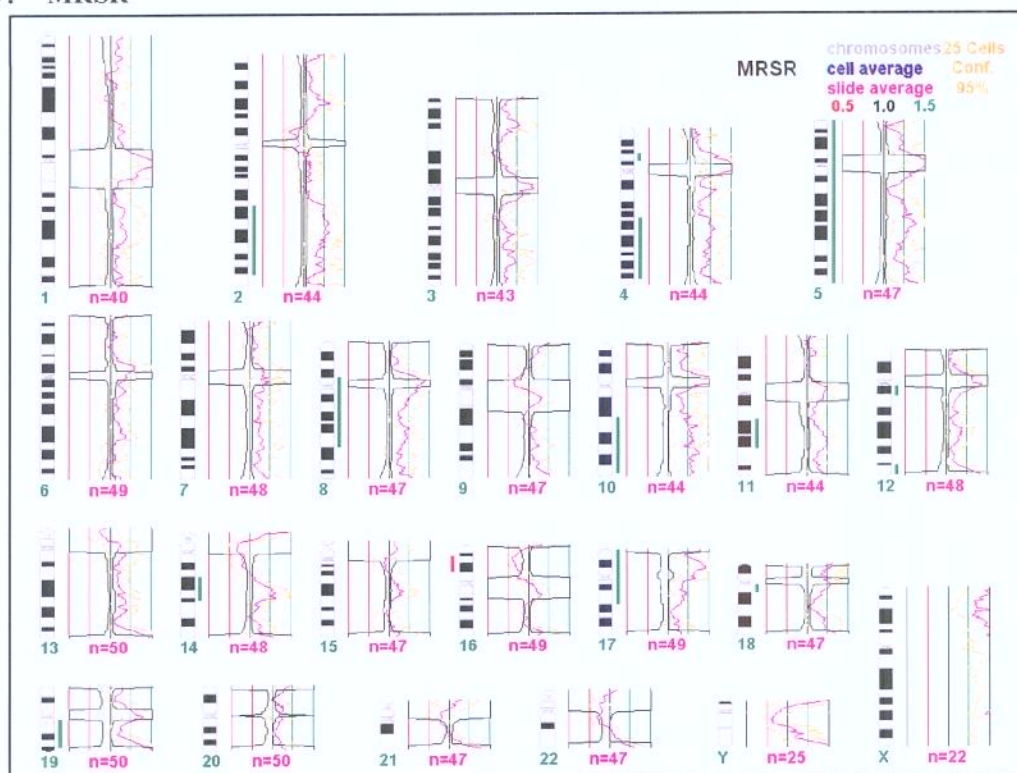


Caso 27: MRSR

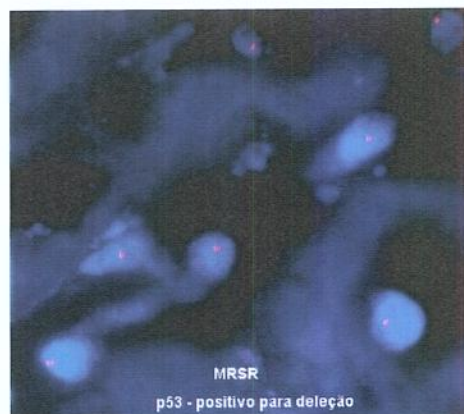
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 27: MRSR



Profile



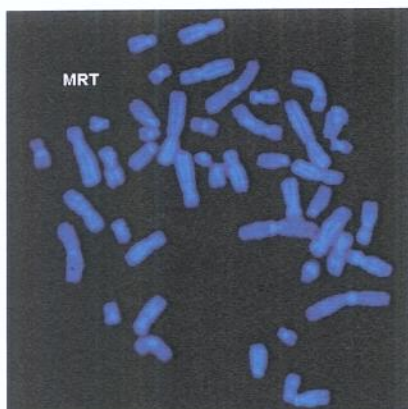
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



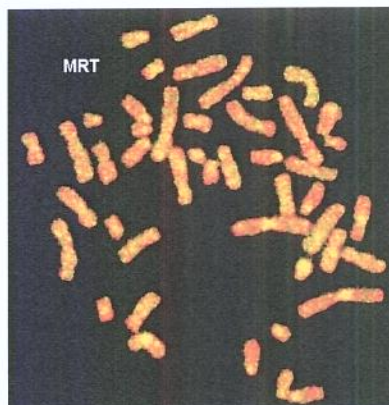
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 28: MRT

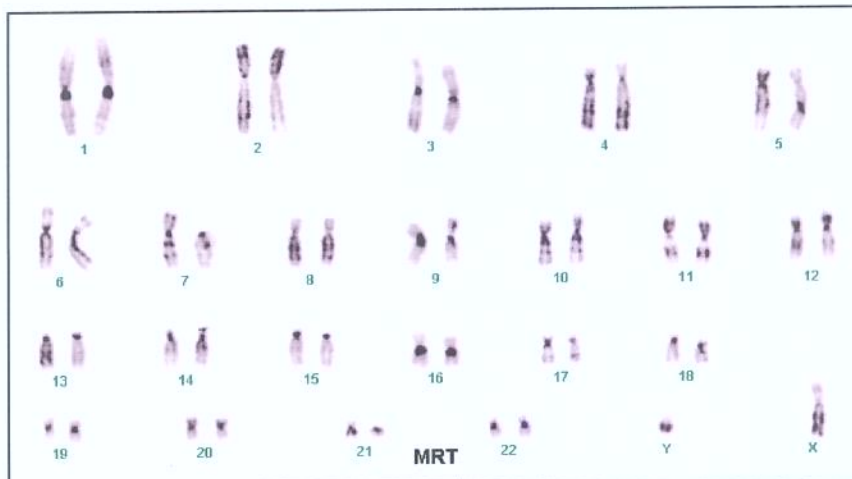
Resultado: +1q21~q22,-3p25,+4p14,+5p13~p14,+6p23~p24,-12p12~pter,-15q14~q15,
+18q11.2



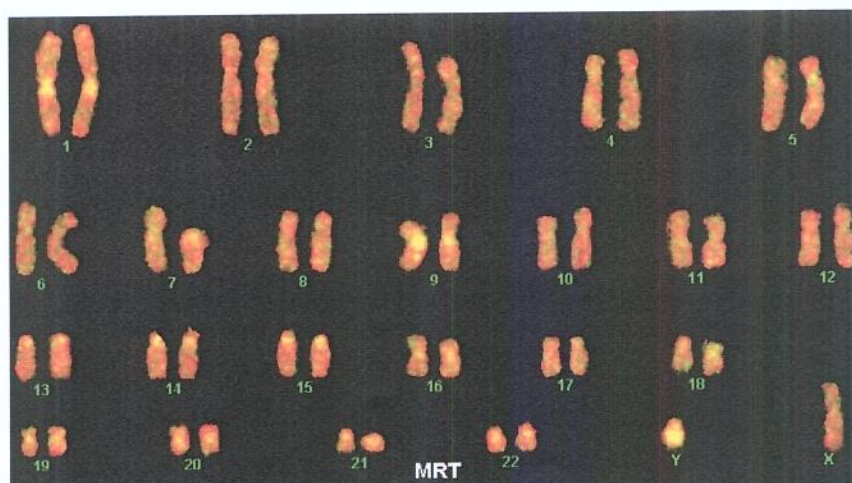
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



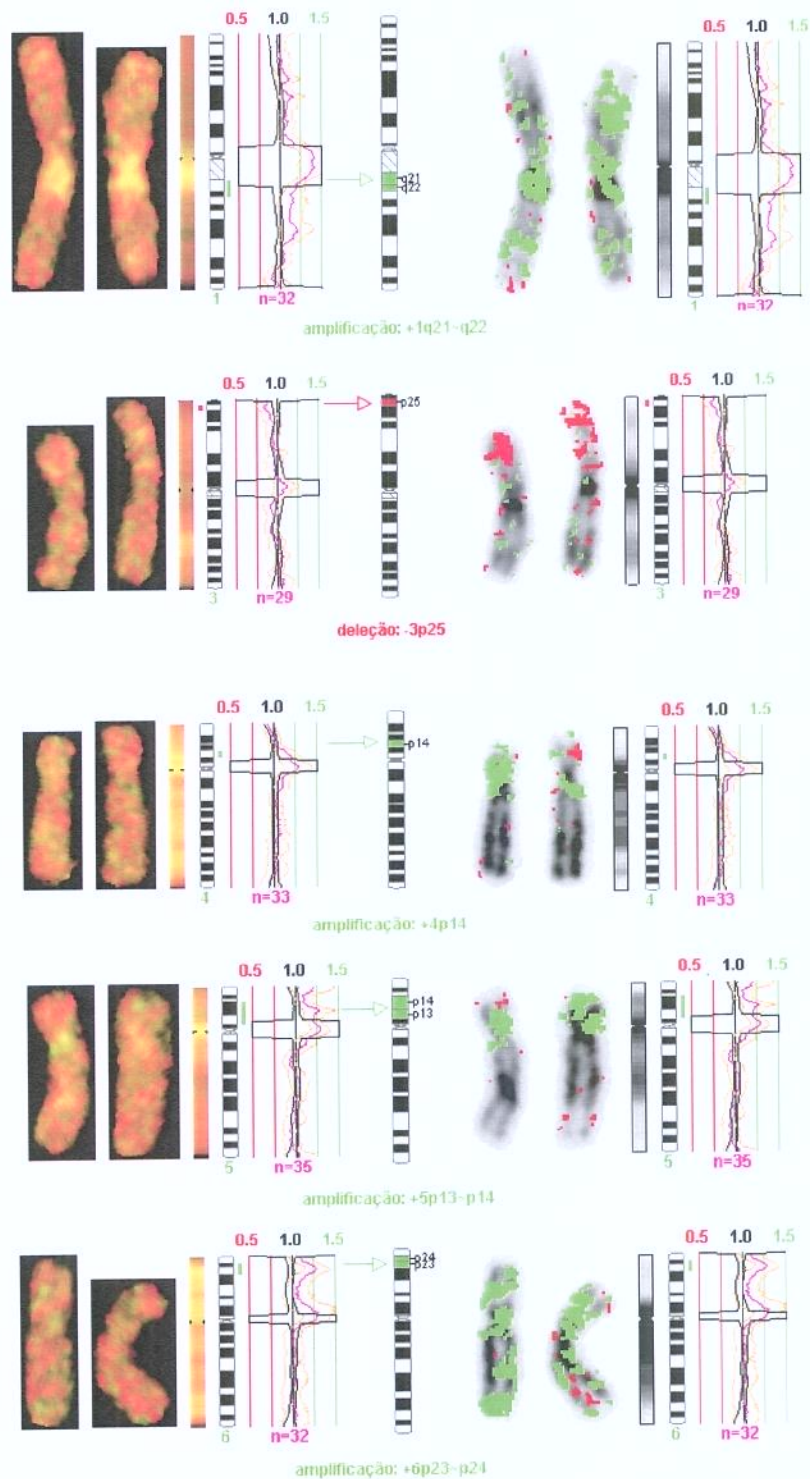
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

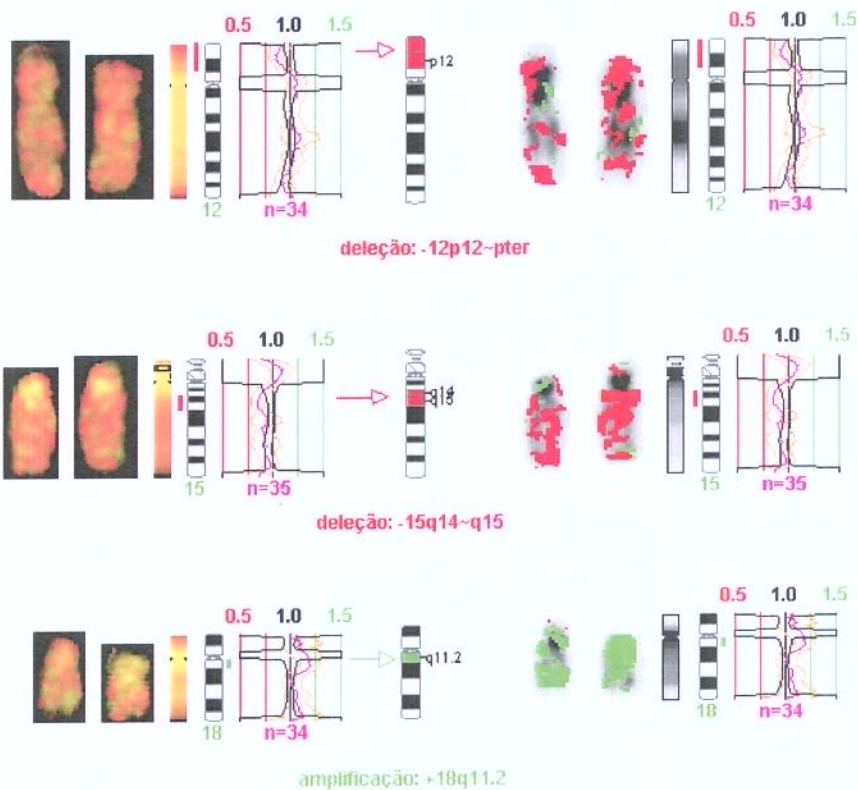
Caso 28: MRT

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

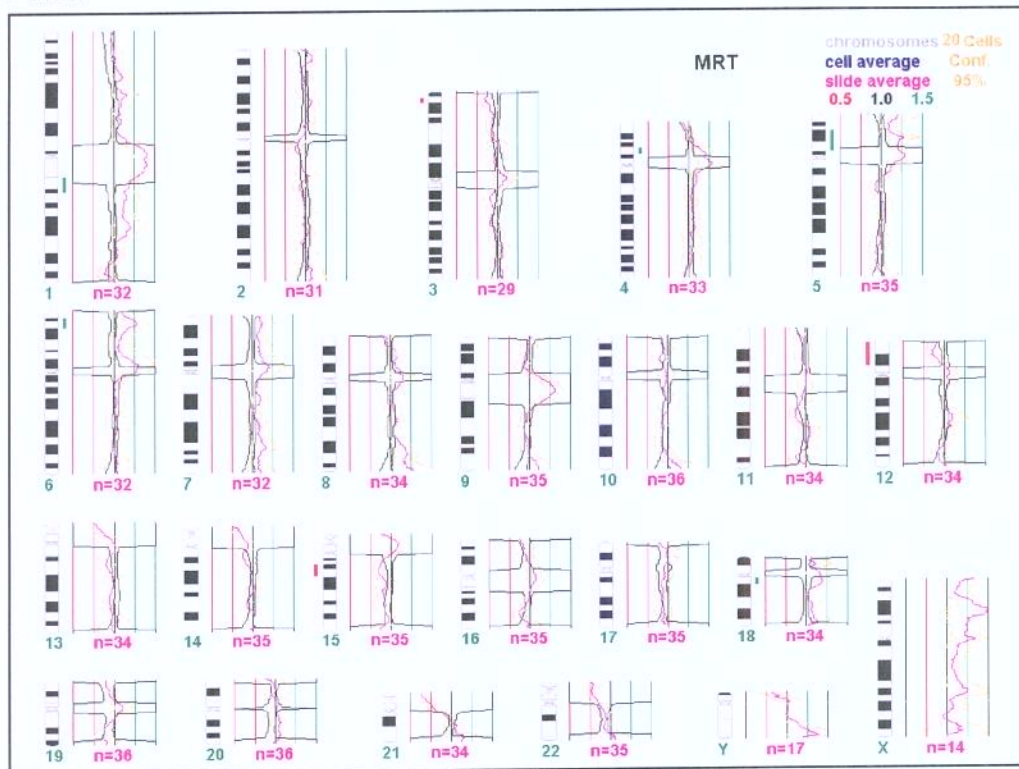


Caso 28: MRT

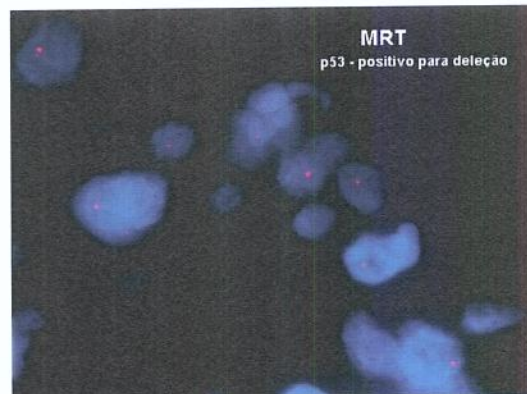
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 28: MRT



Profile



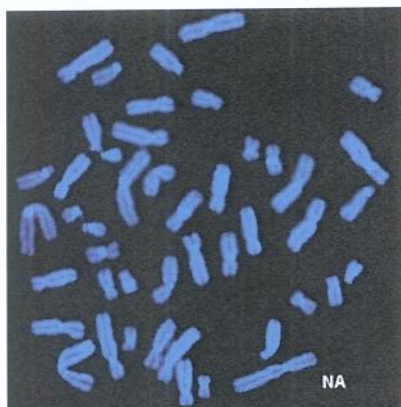
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 29: NA

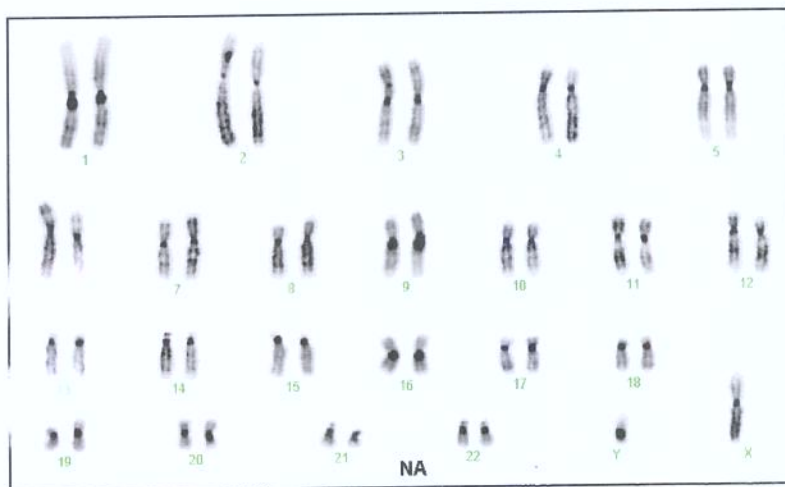
Resultado: +1p12~p22,+1q31,+4q13,+6p11.2~p21.2,+10q25~qter,+11p14~pter,+11q23,
+13q14~qter,+14q24~q31,+15q22~qter,+16q12.1~q21,-21q11.2~q21



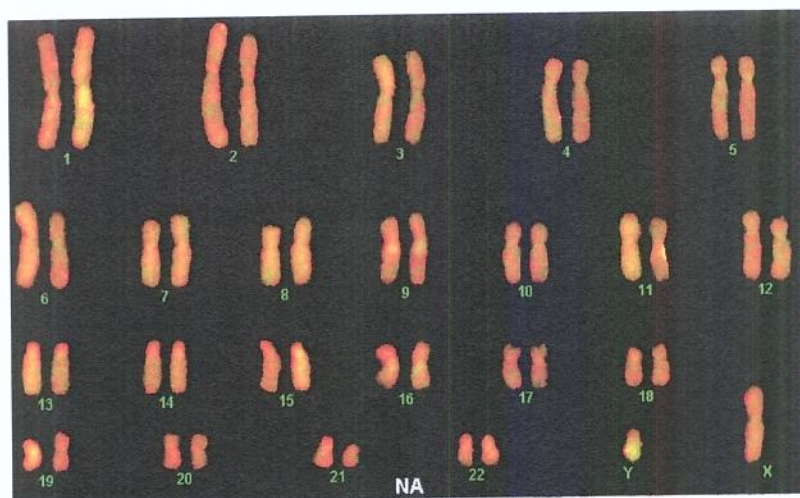
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

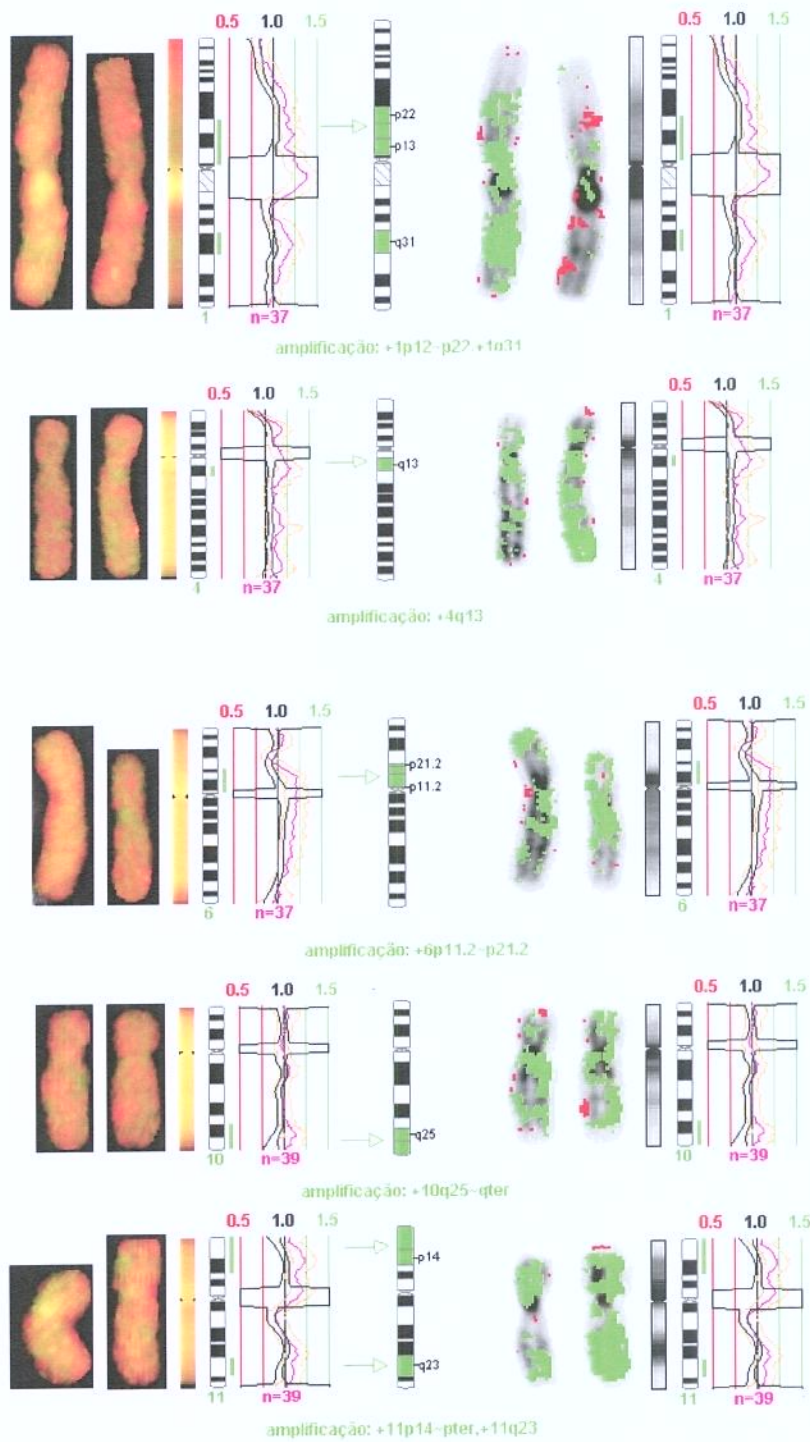


Cariótipo DAPI invertido

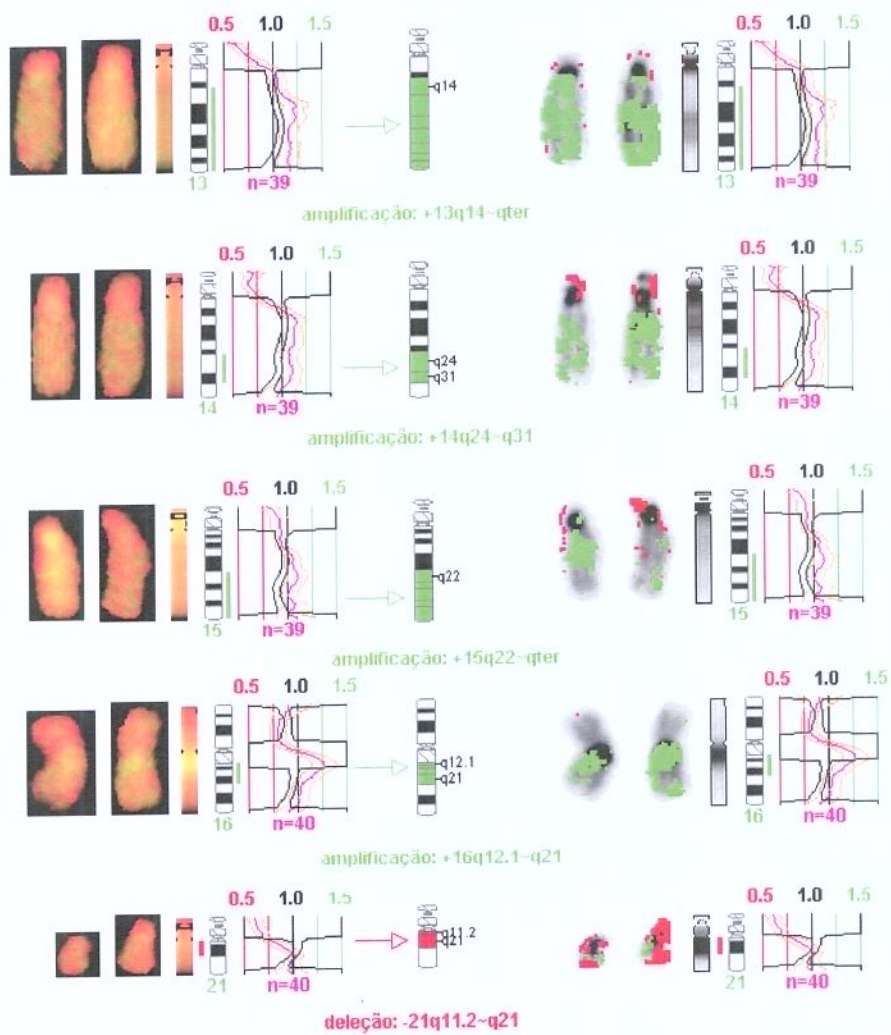


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

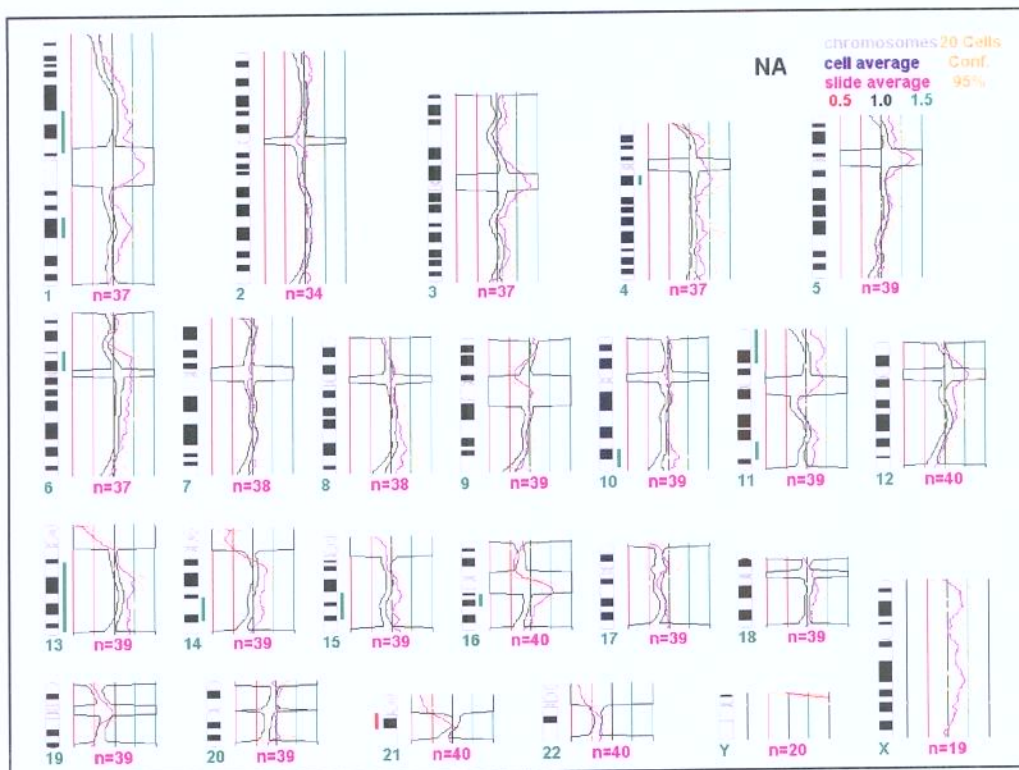
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



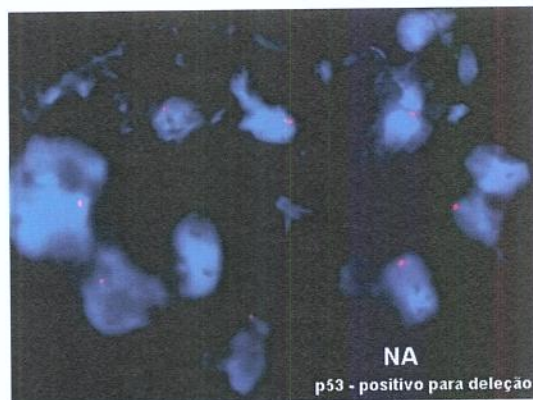
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



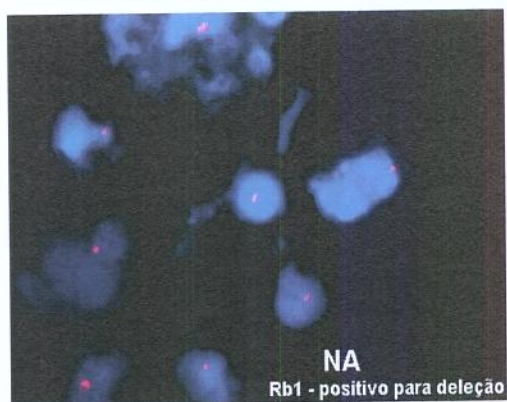
Caso 29: NA



Profile



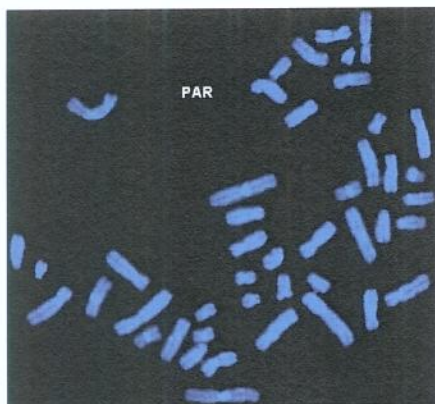
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



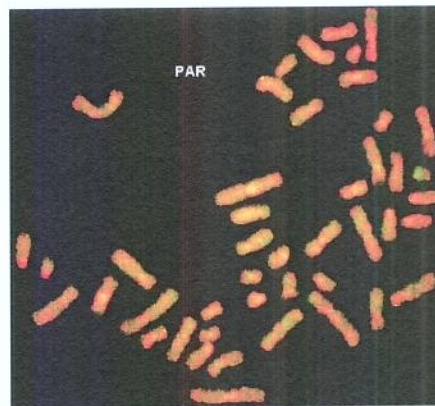
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 30: PAR

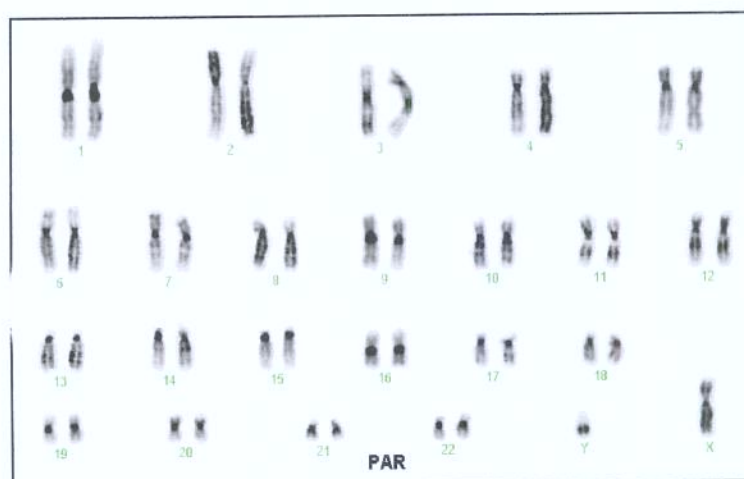
Resultado: +1p31~p34.2,+2p24~pter,+3q12~q13.3,+3q26.1~q26.3,+4q13~q33,+5q21~qter,+7p14~p15,+7q31~qter,+8q23 ~ qter,-9q21,+9q22 ~ qter,+10q25 ~ qter,+11p14,+12p13,+12q13~q21,+13q21~qter,-14q11.2~q12,-15q11.2~q12,-16p11.2,+18q21~qter,-21q11.2~q21



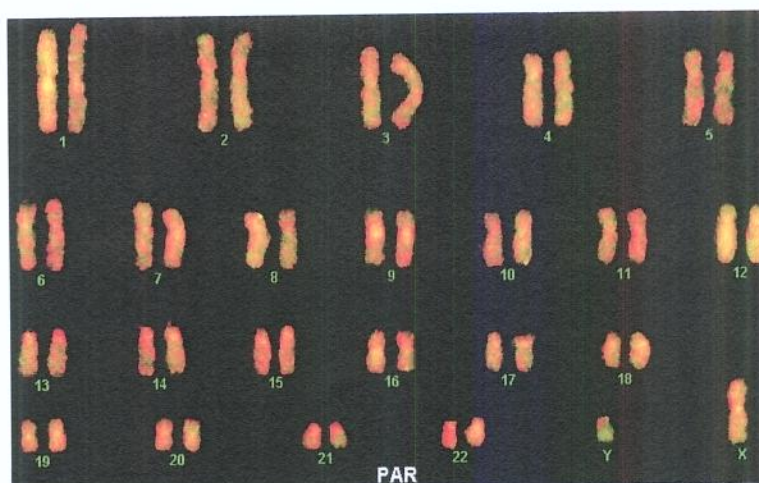
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



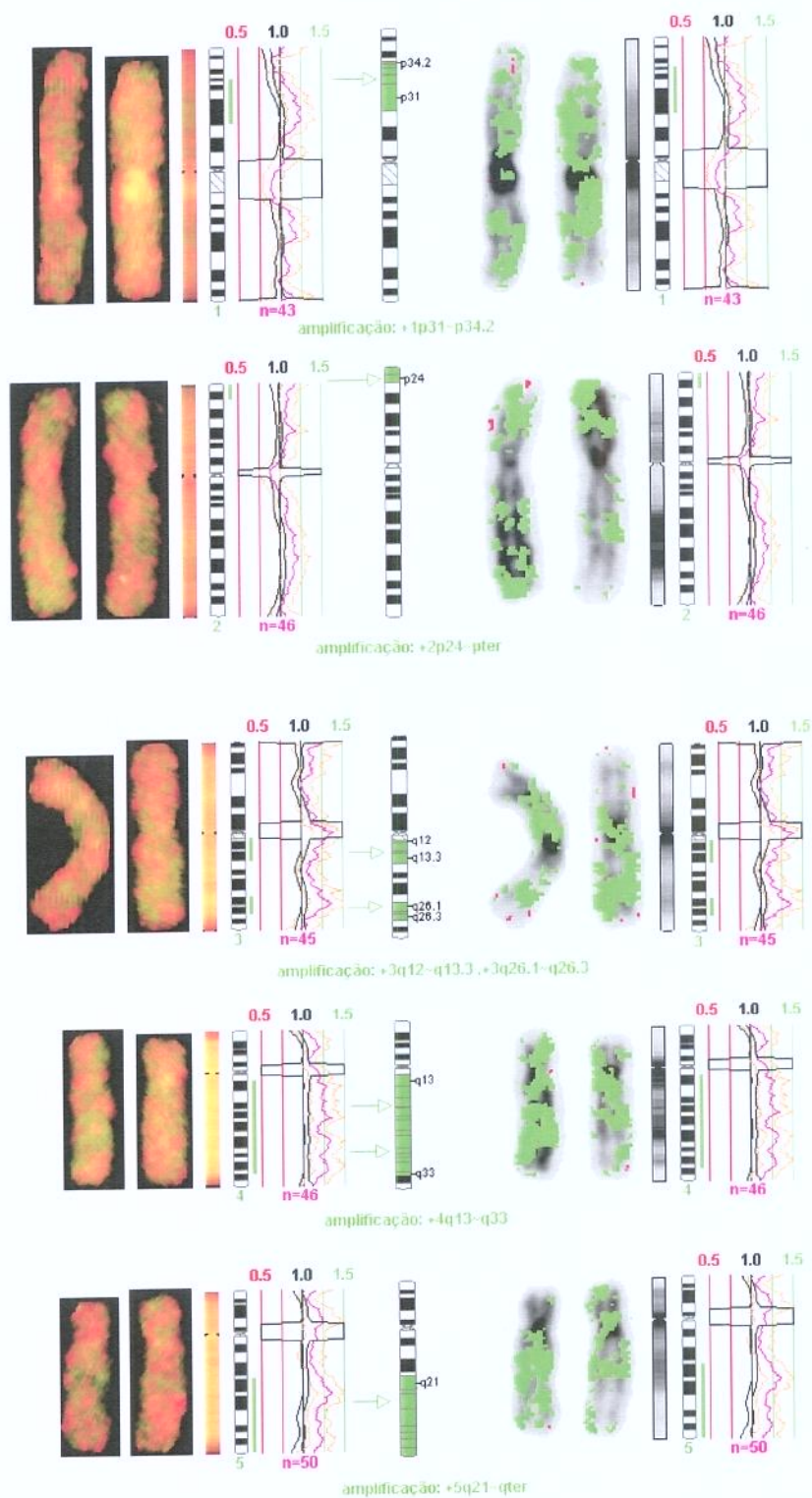
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

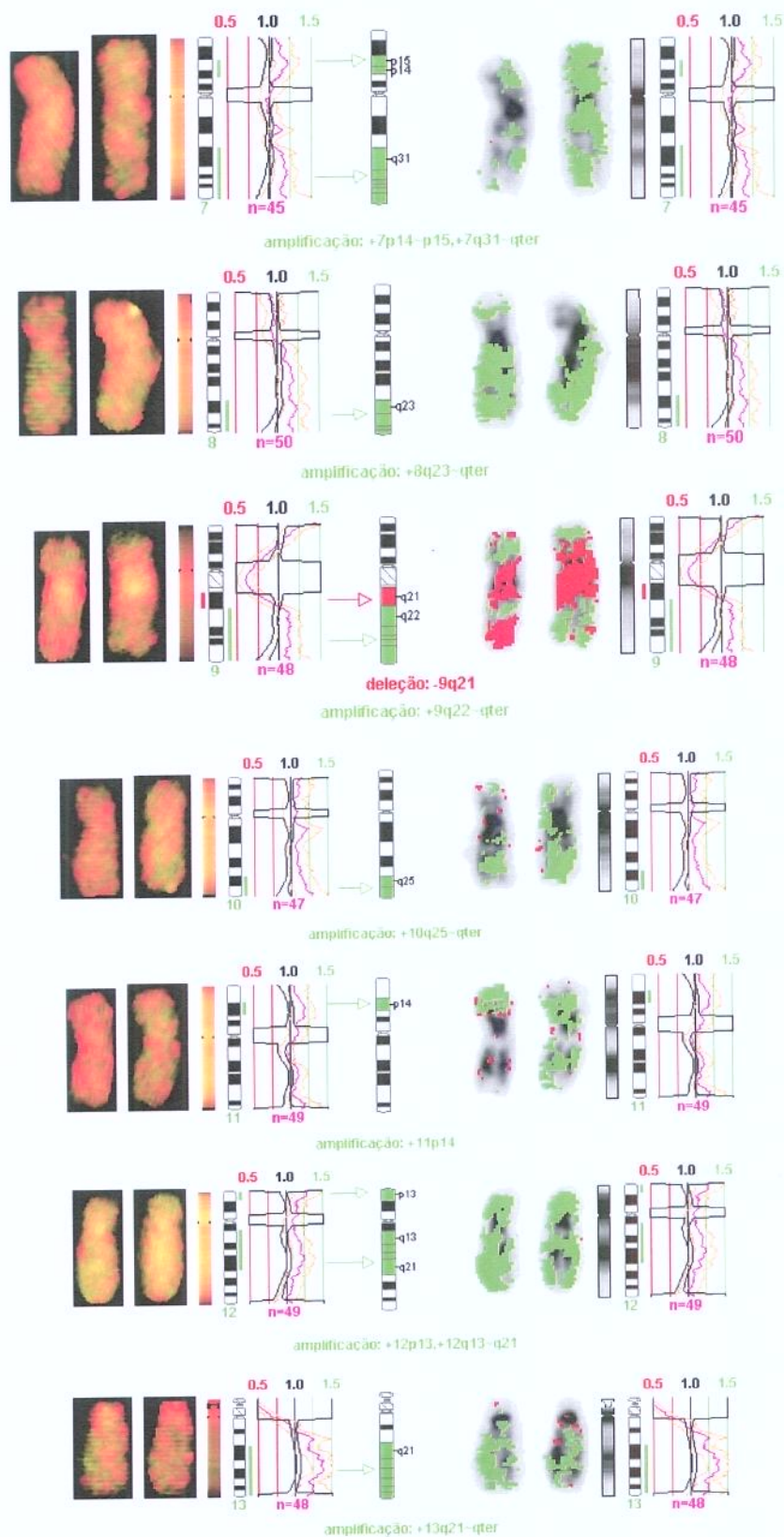
Caso 30: PAR

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



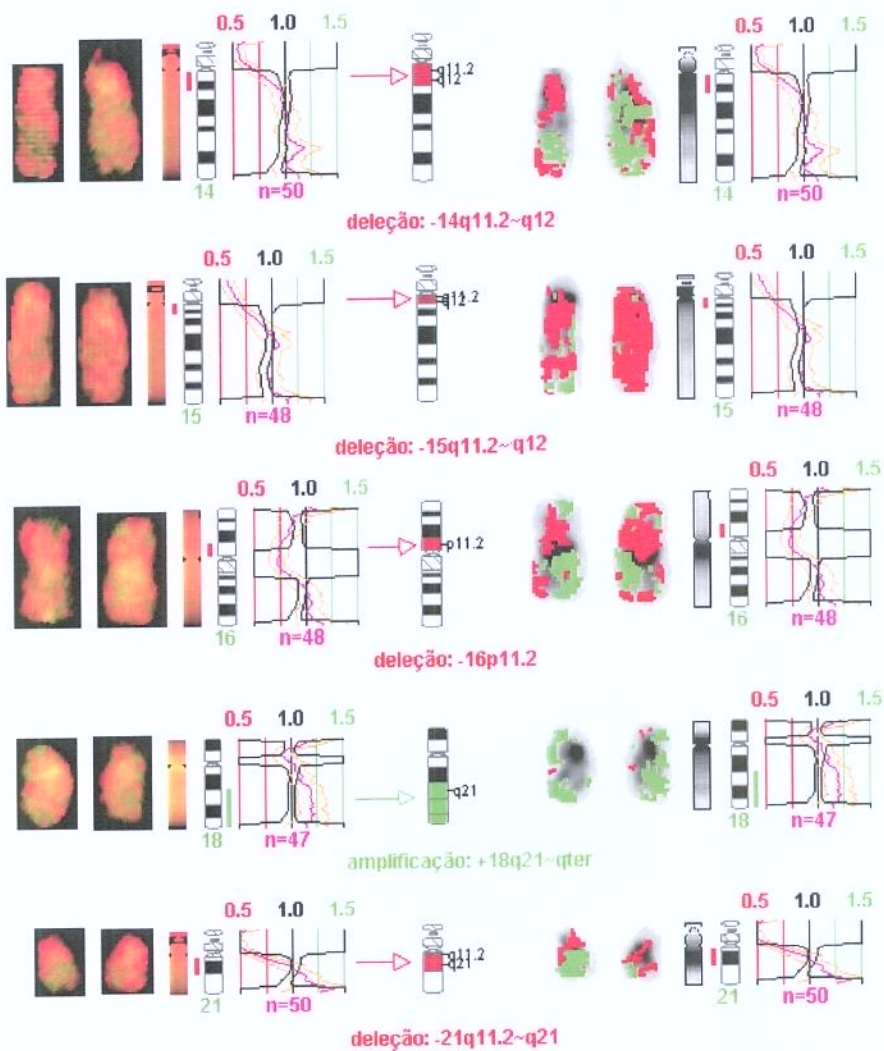
Caso 30: PAR

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

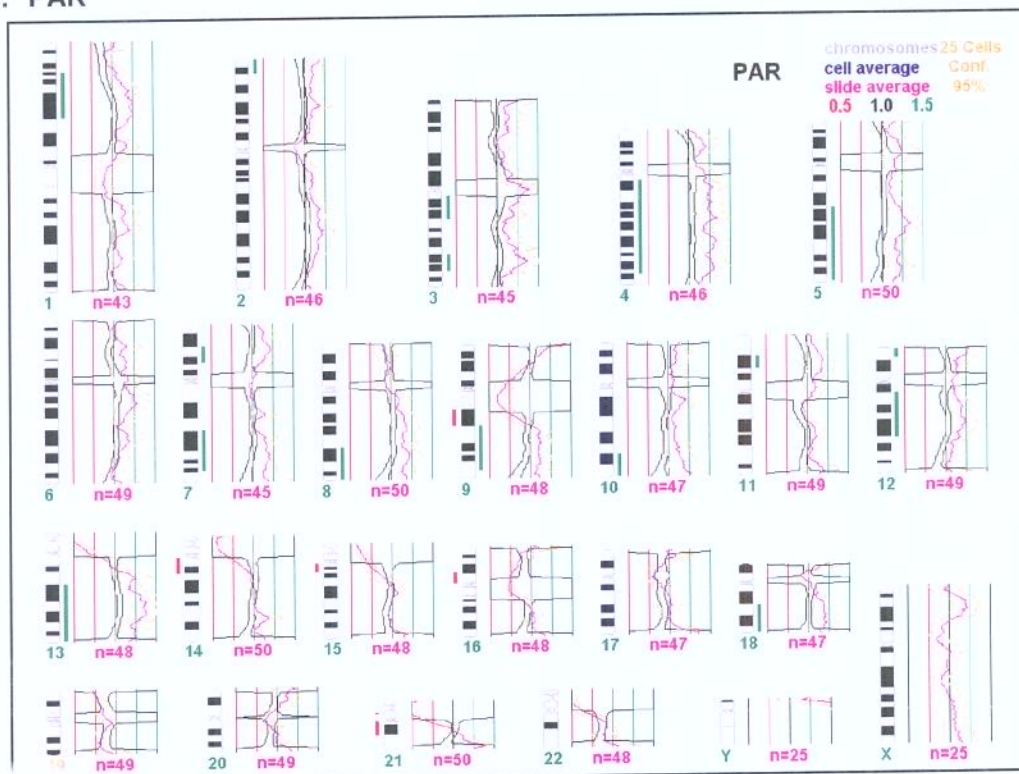


Caso 30: PAR

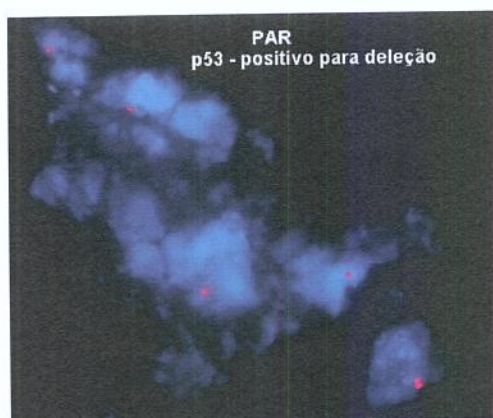
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 30: PAR



Profile



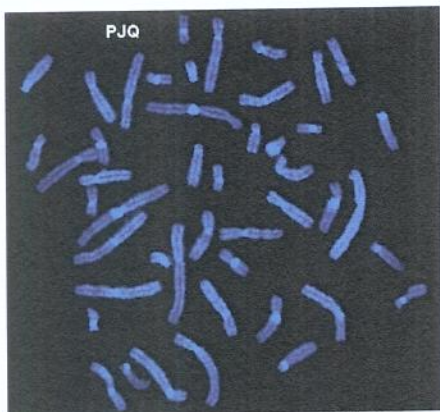
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 31: PJQ

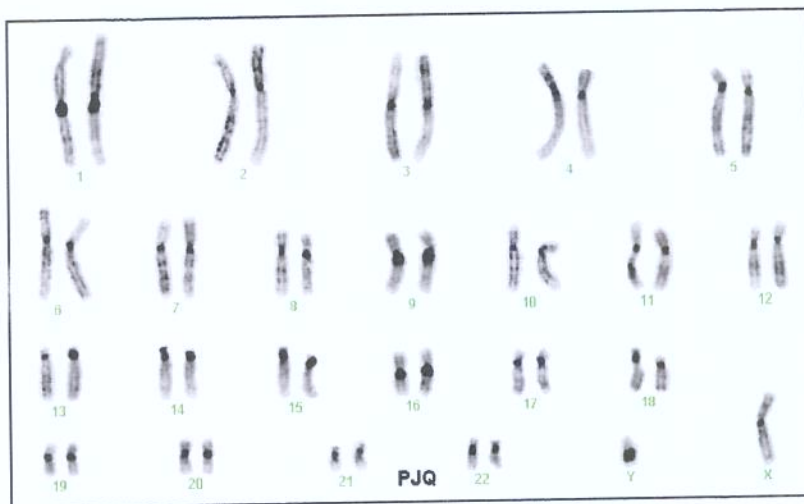
Resultado: +1q24~q25,+3q12,+4q12~q13,+6p21.1~q12,+14q24,-15q15,+16q12.2~q21,
+17p13~q12,+18p11.3~q11.2



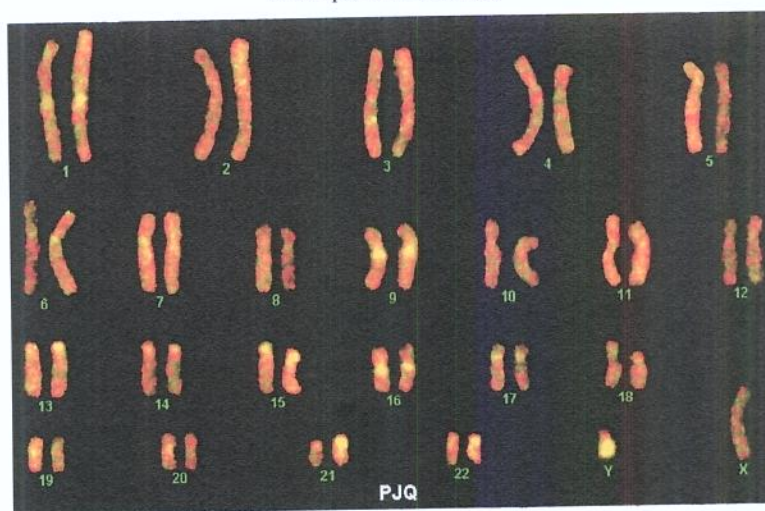
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



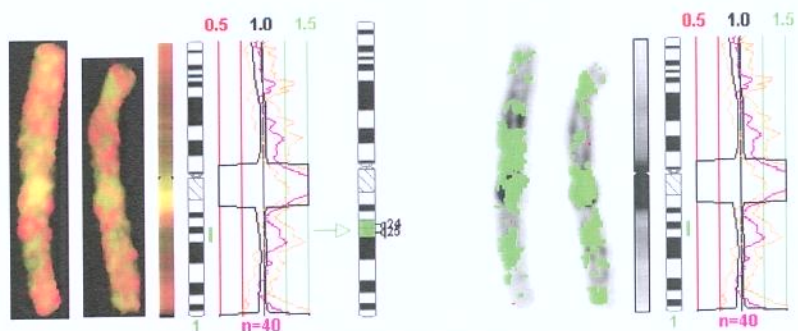
Cariótipo DAPI invertido



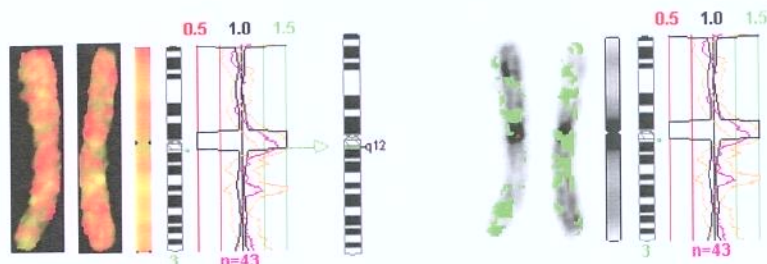
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Caso 31: PJQ

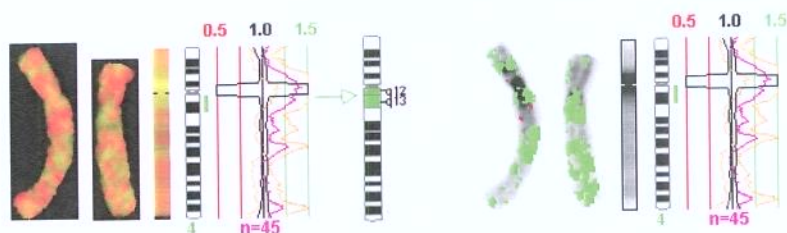
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



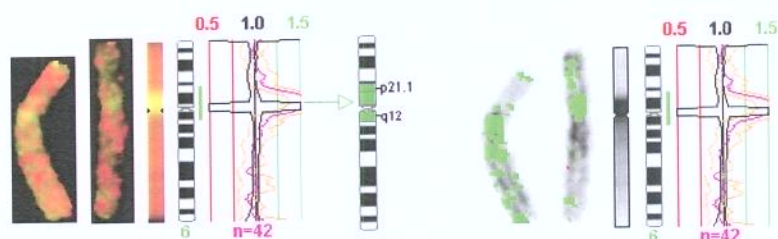
amplificação: +1q24-q25



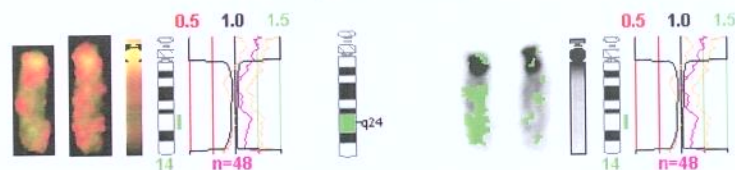
amplificação: +3q12



amplificação: +4q12-q13

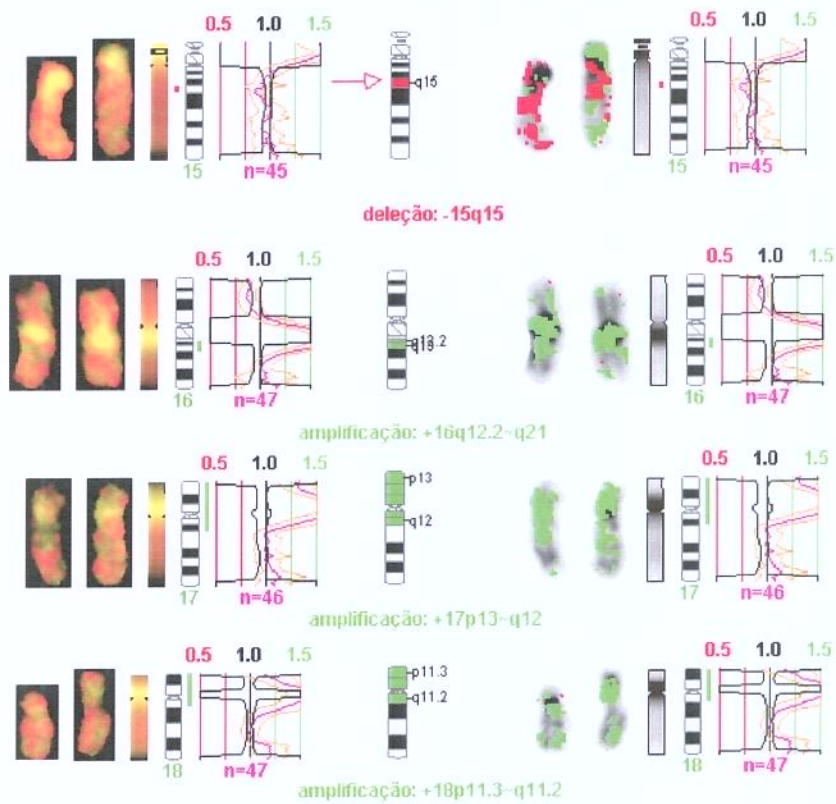


amplificação: +6p21.1-q12

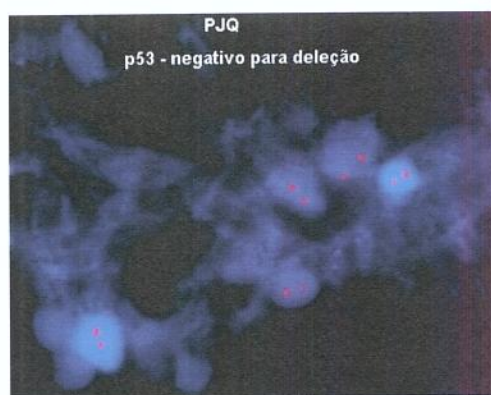
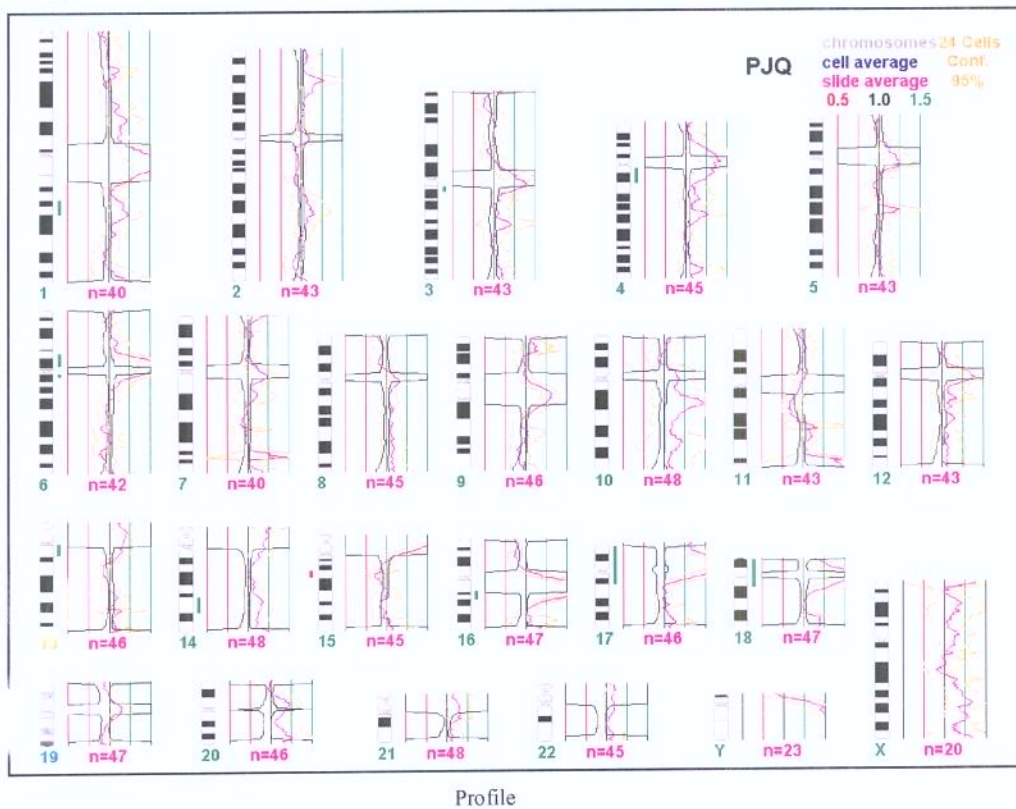


amplificação: +14q24

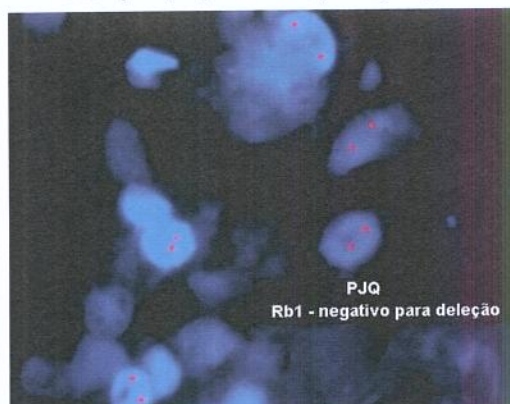
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 31: PJQ



FISH para pesquisa da deleção do gene p53

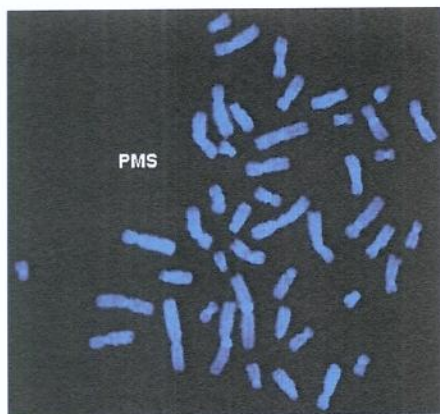


FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

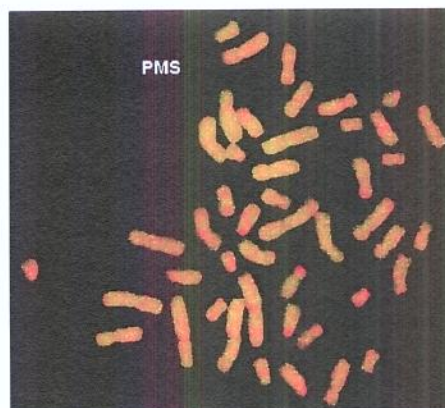
Caso 32: PMS

Resultado:

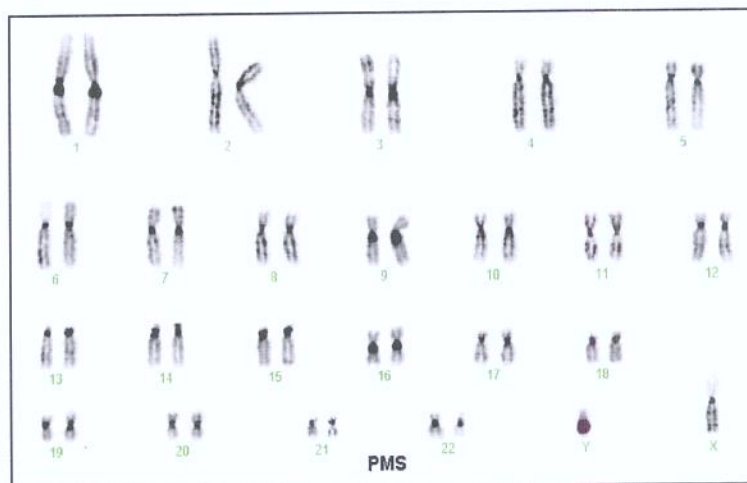
+1p31~p35,+2p25,+2q35~qter,+3p14~p24,+4q24~q31.3,+5q14~q32,+6q21~q23,
+7p15,+8q21.3~qter,-9q21,+10q24~qter,+11p13~pter,+11q14~qter,+12q24.2~qter,
+13q14~qter,+14q21~qter,-15q11.2,-16p11.2~p12,+16q23~qter,+18q12~qter,
-21q11.2,-22q11.2,+22q13



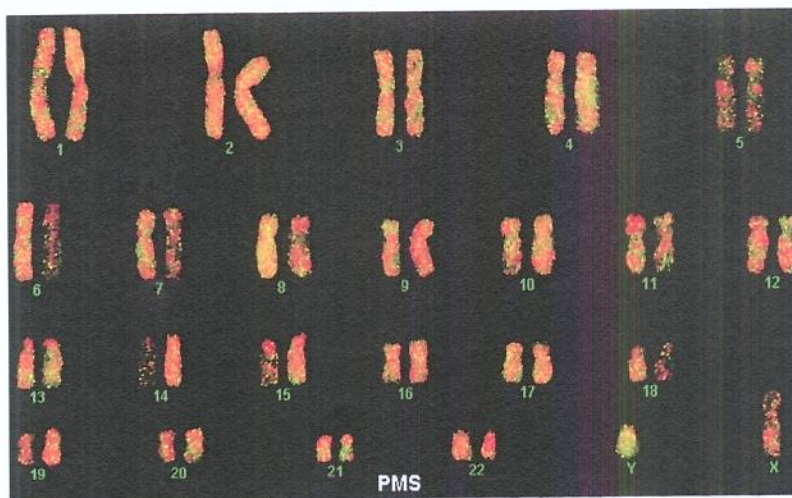
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

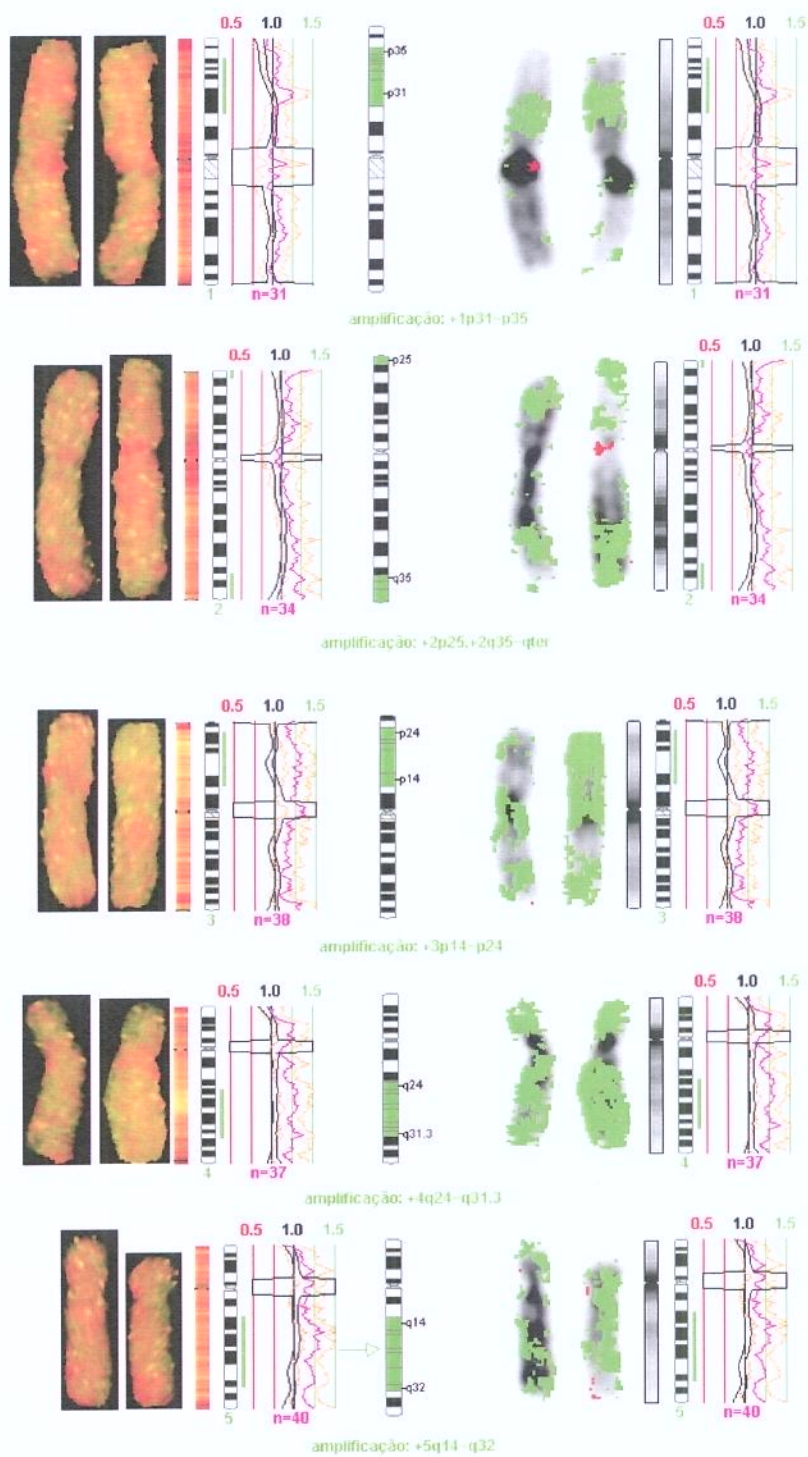


Cariótipo DAPI invertido

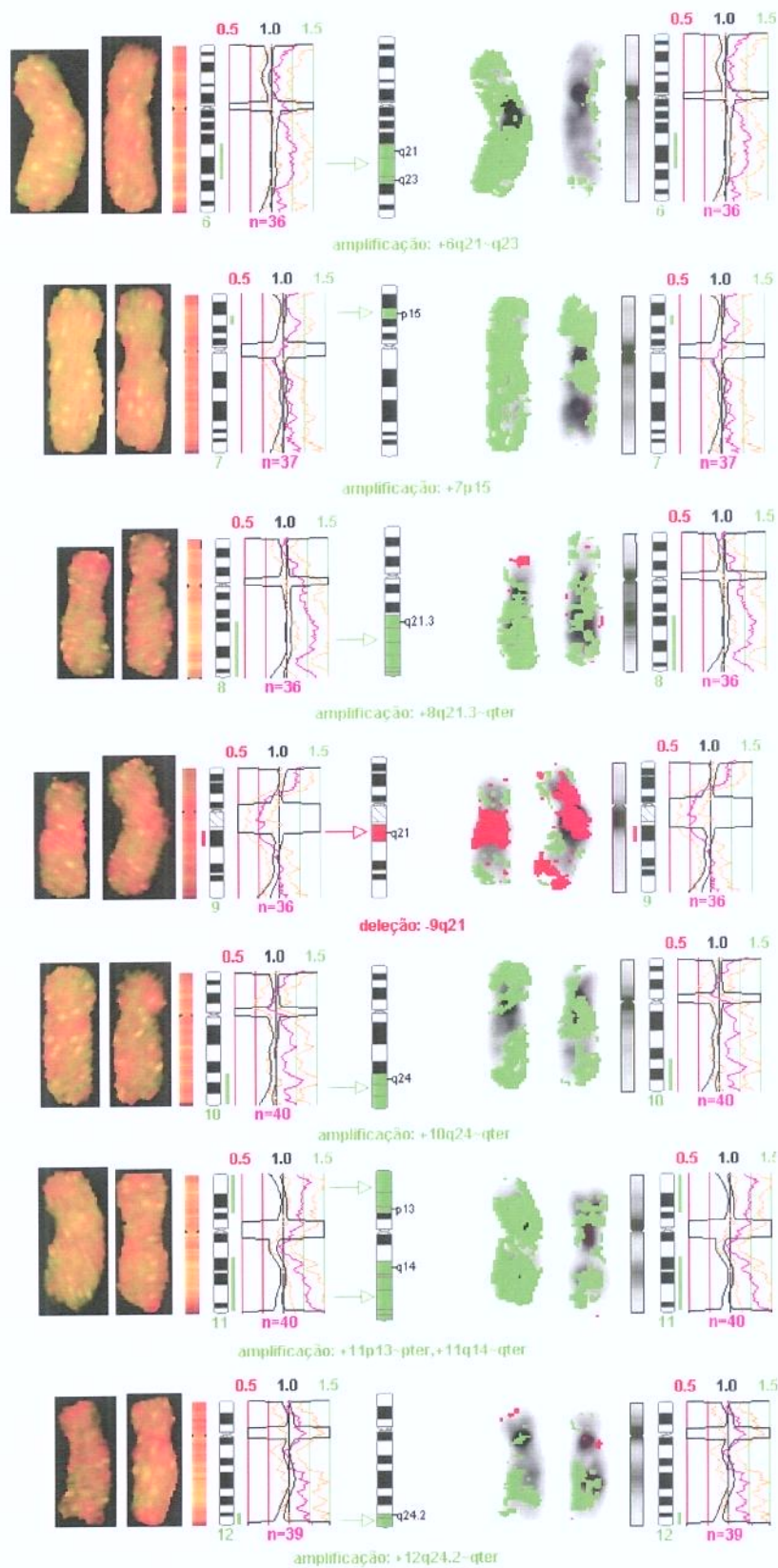


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

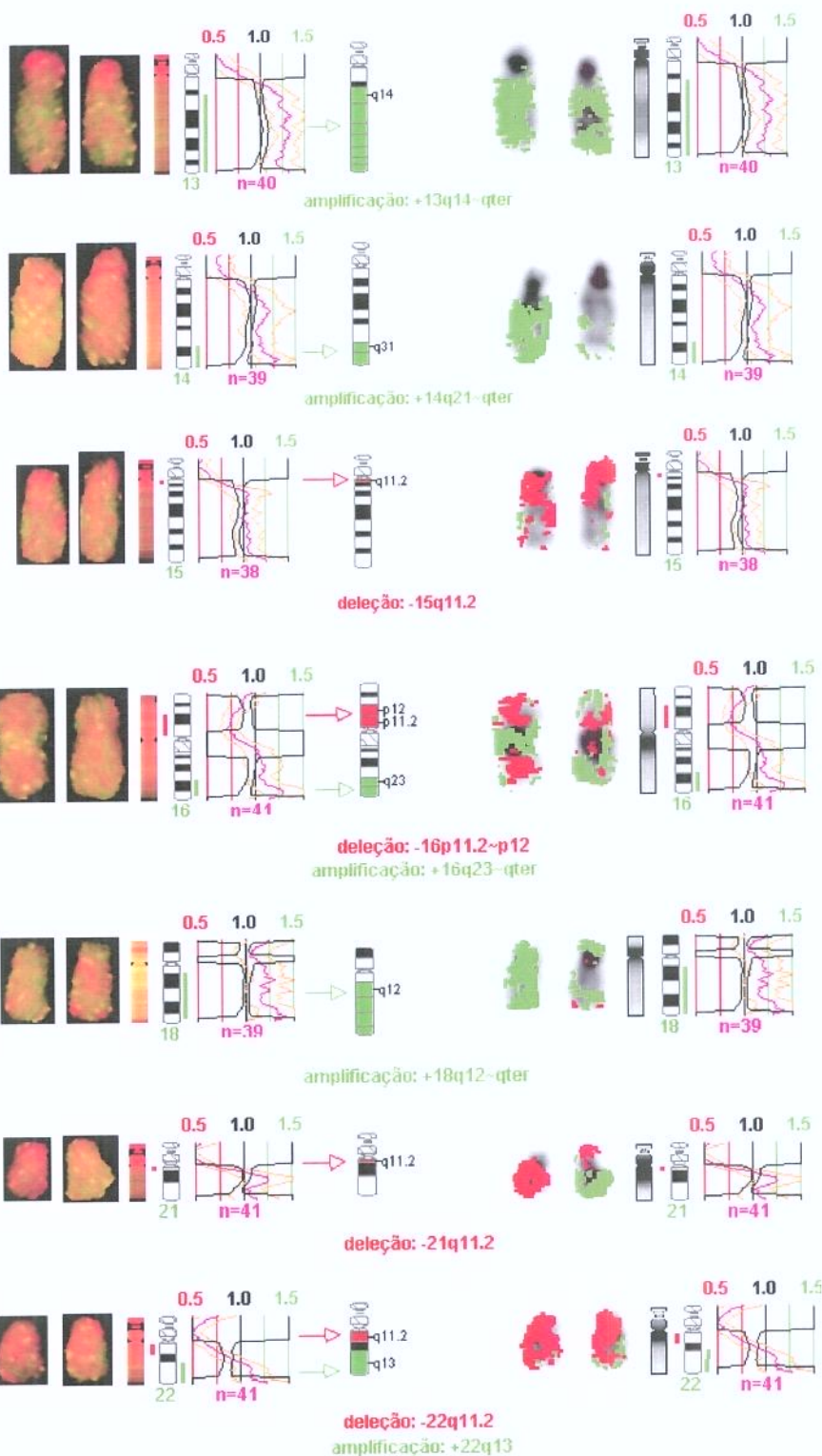
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



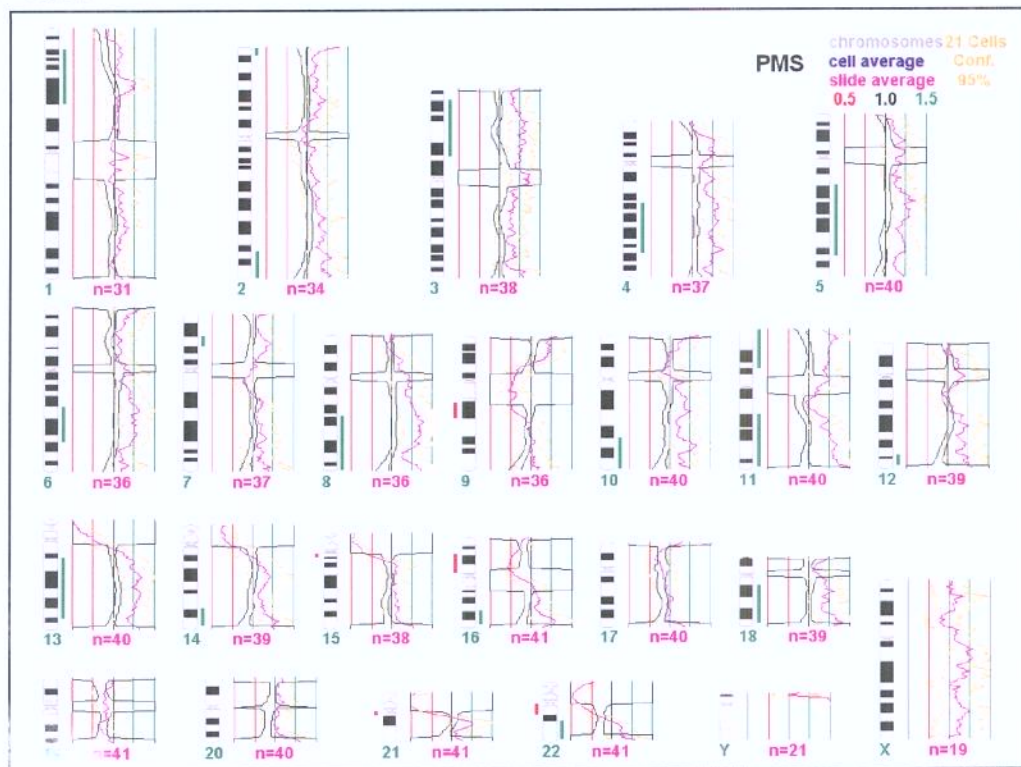
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



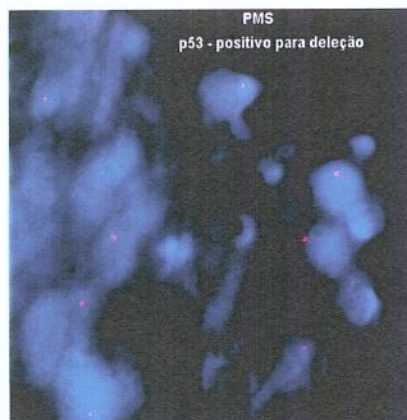
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



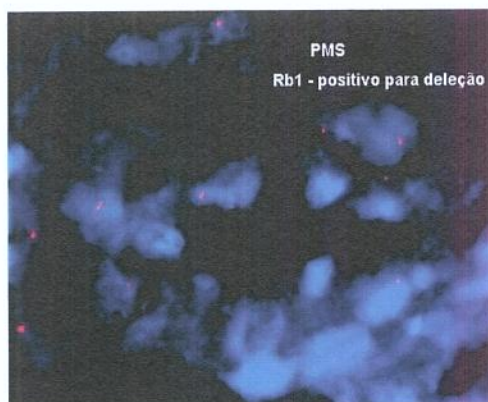
Caso 32: PMS



Profile



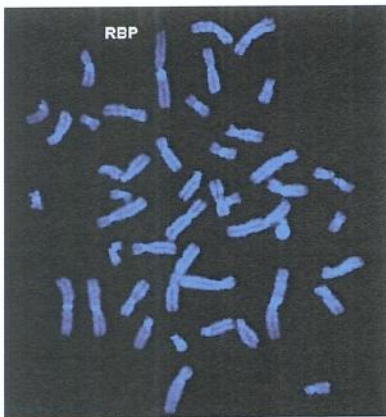
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



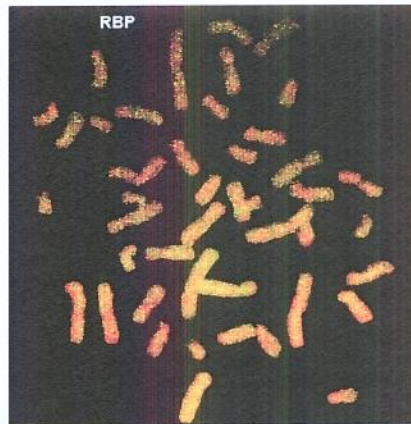
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 33: RBP

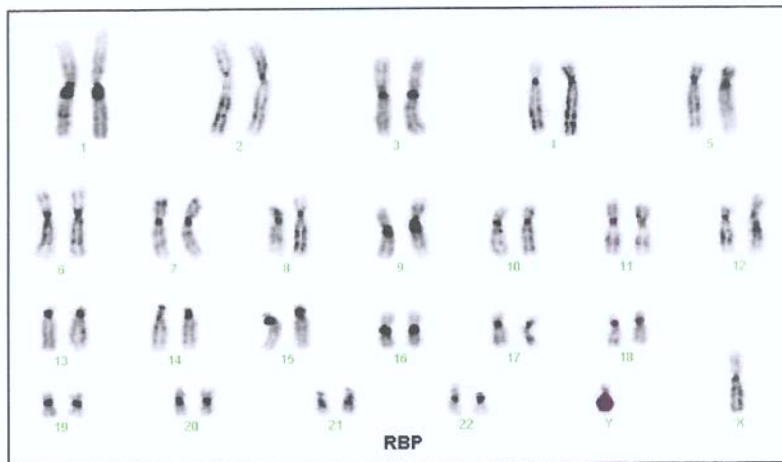
Resultado: +6q16~q21



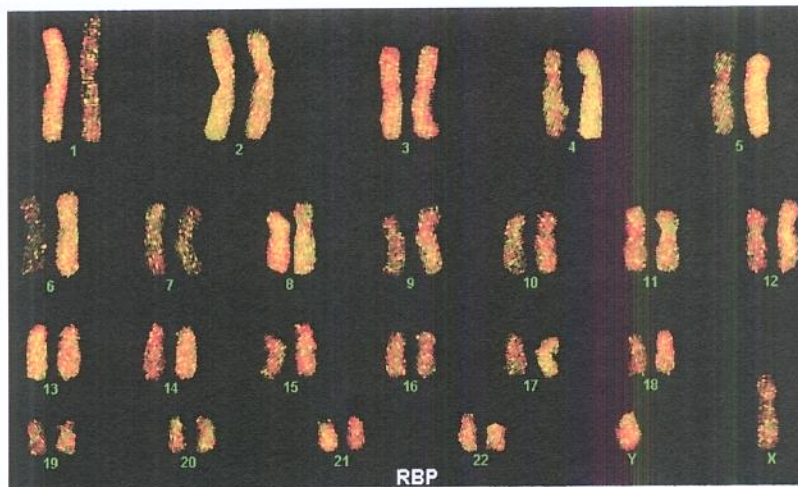
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



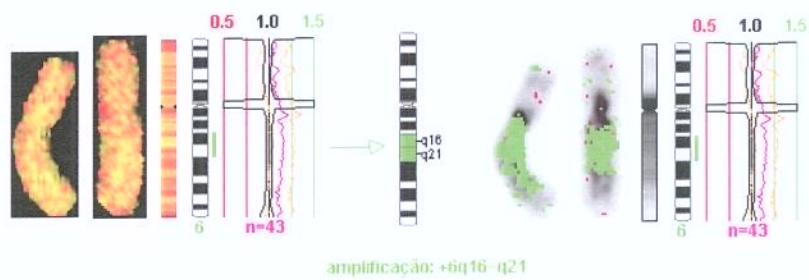
Cariótipo DAPI invertido



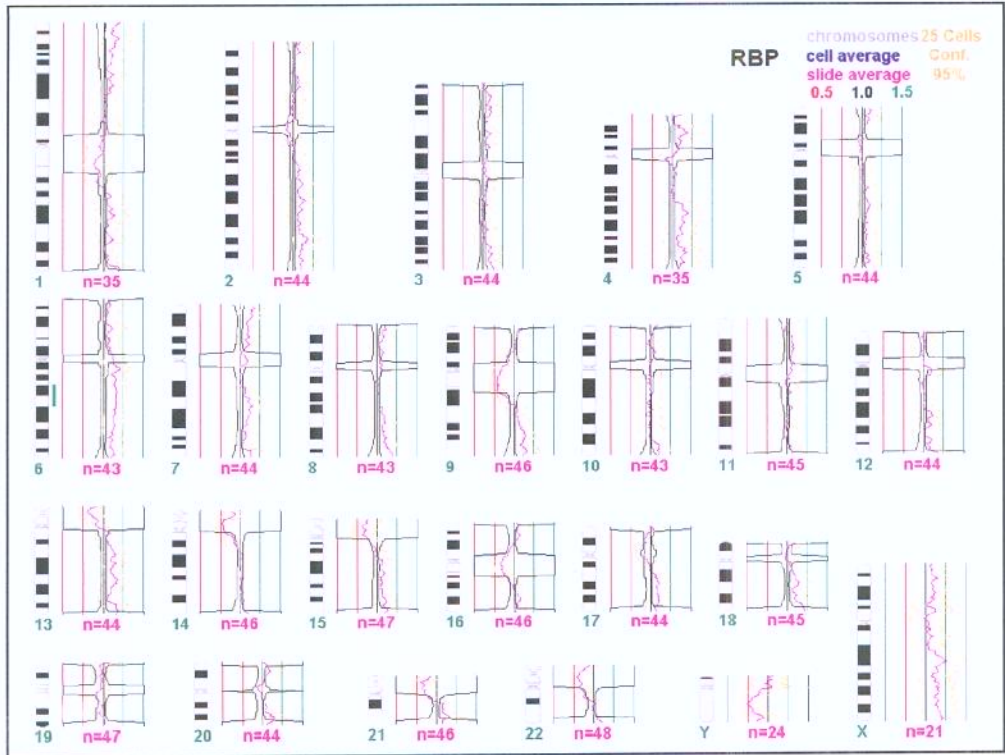
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Caso 33: RBP

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 33: RBP



Profile



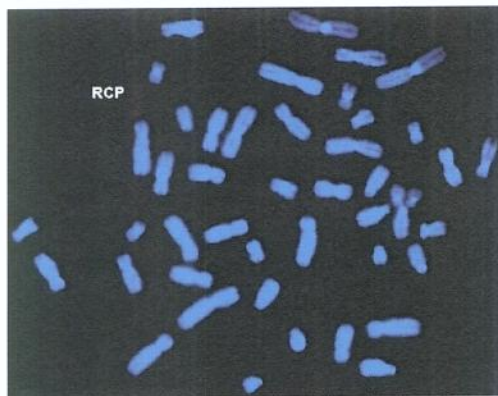
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



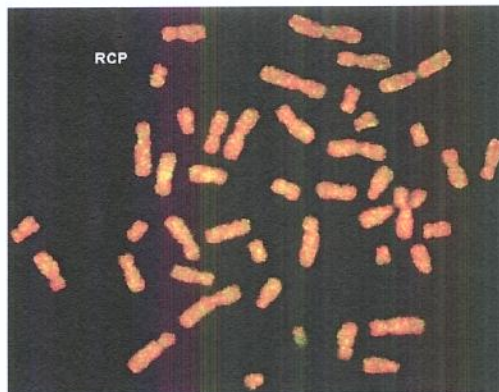
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 34: RCP

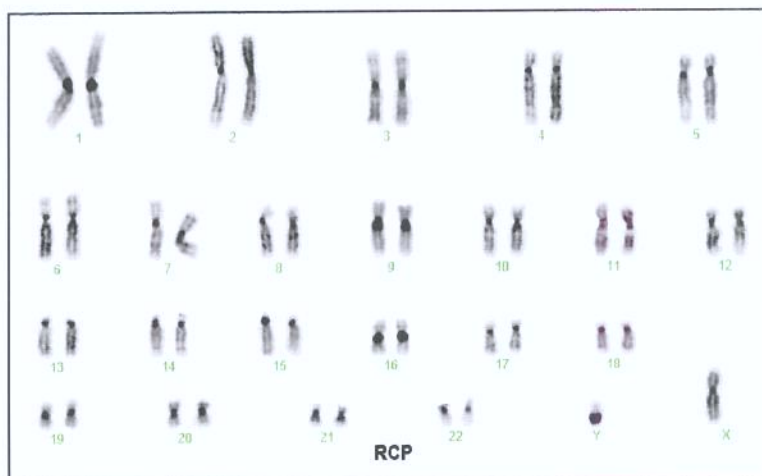
Resultado: +1p31,+1q31~q32,+2p25,+3q24~q27,+5q23,+6q12~q22,+7q22~q31,+8q11.2~q13,
+9p21~p23,+10q22,+11p12,+13q21



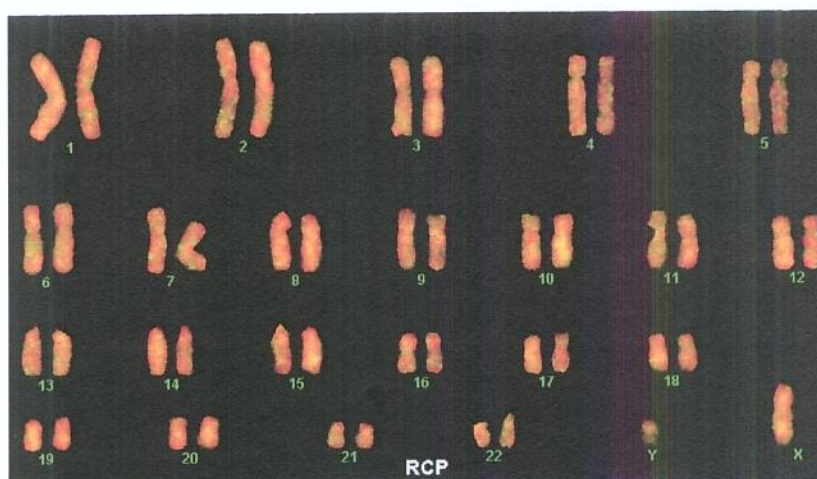
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



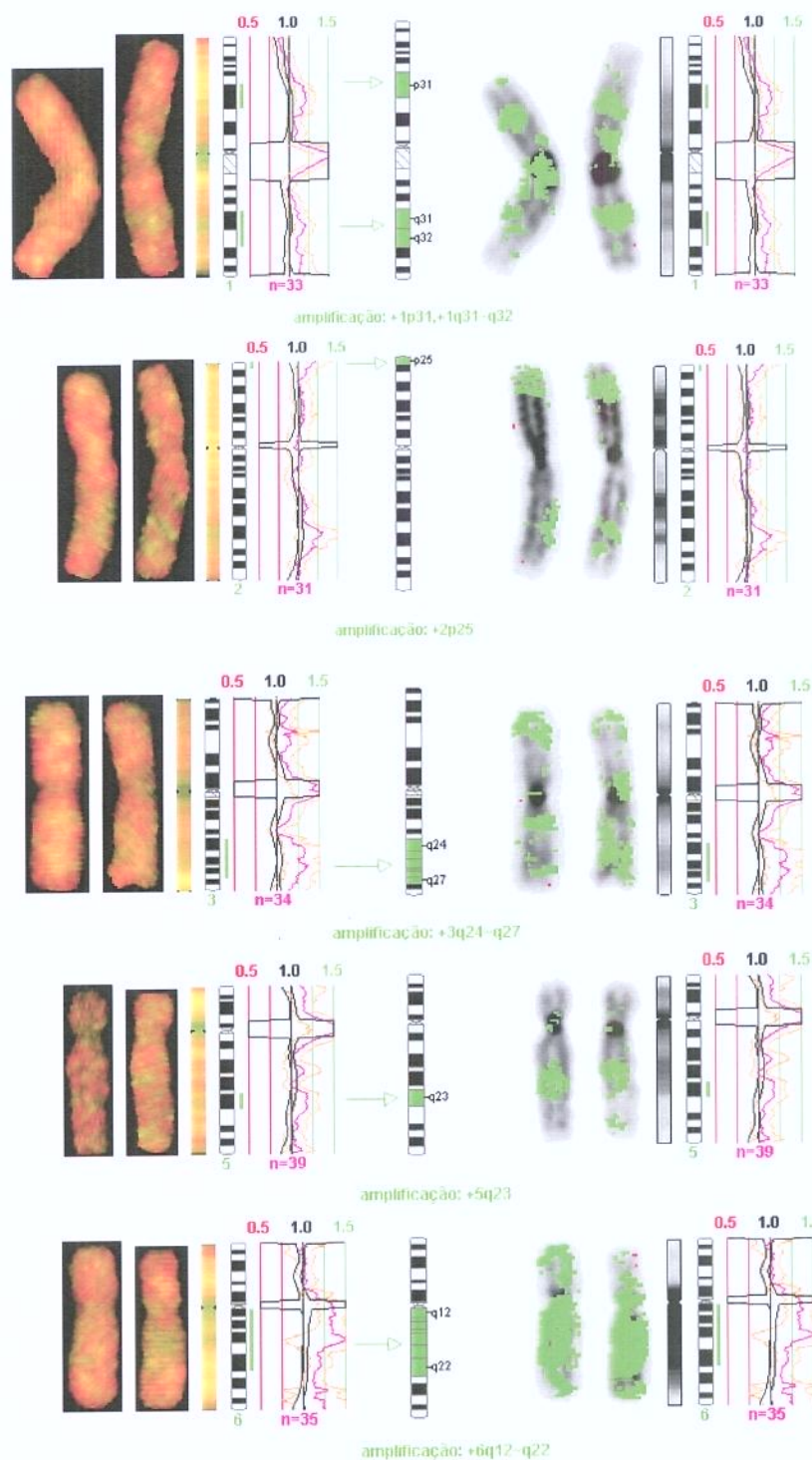
Cariótipo DAPI invertido



Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

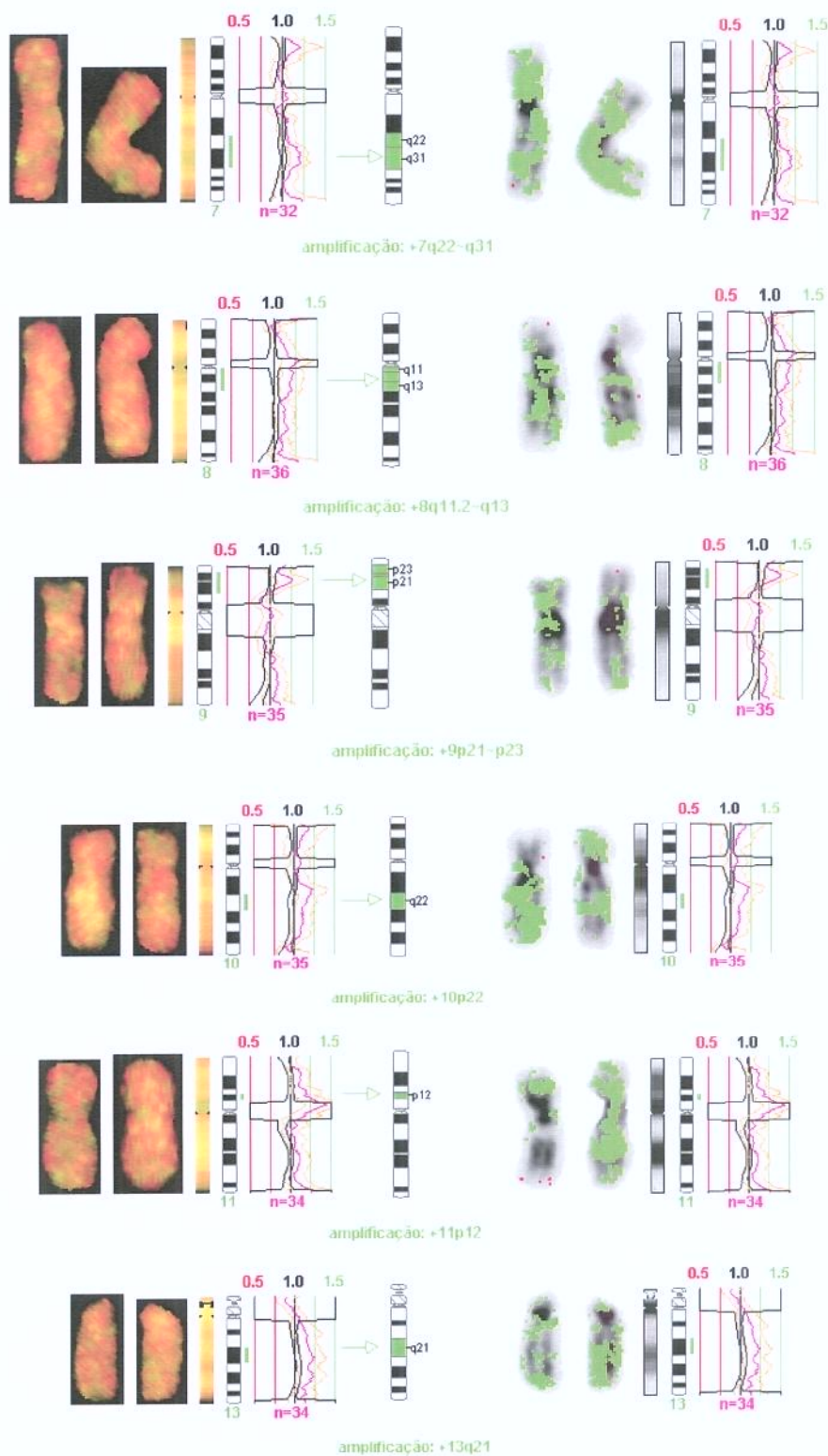
Caso 34: RCP

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

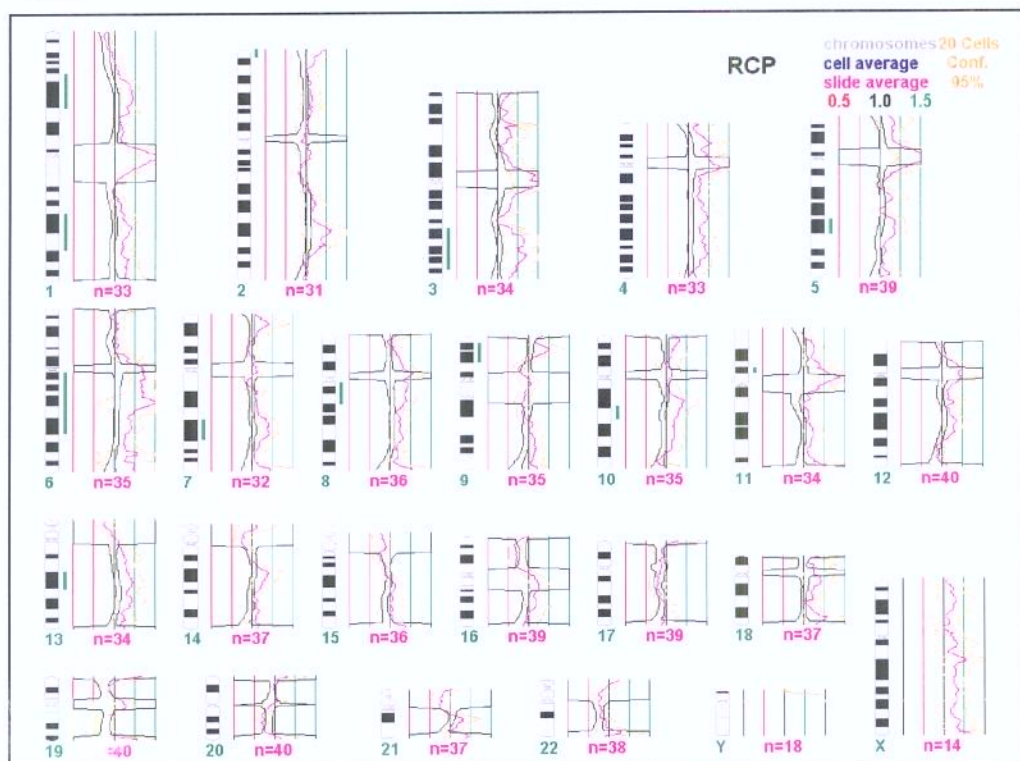


Caso 34: RCP

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



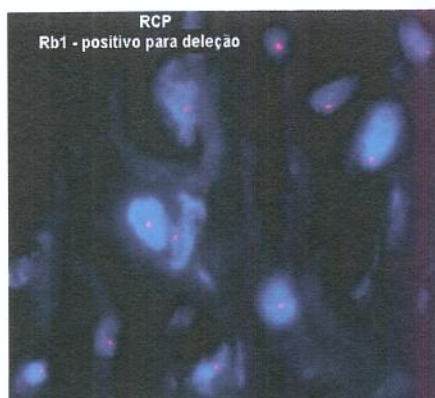
Caso 34: RCP



Profile



FISH para pesquisa da deleção do gene p53

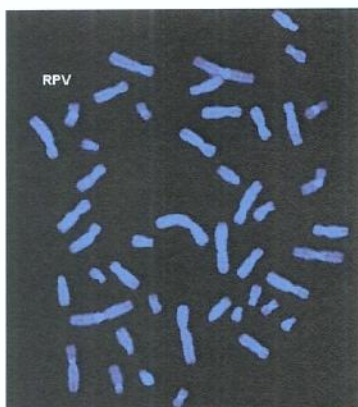


FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

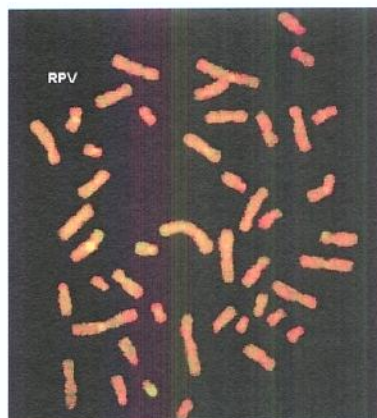
Caso 35: RPV

Resultado:

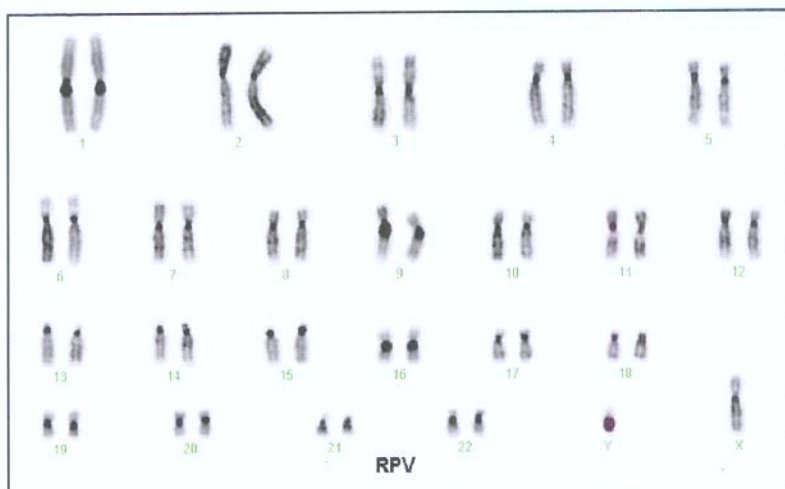
+1p13~p35,+1q31~q41,+2p22~pter,+2q22~qter,+3q12~q26.1,+4q26,+5q14~q21,
+5q34~qter,+6p21.1~p21.2,+6q21~qter,+7p21,+7q36,+8q22~qter,-9p13~p21,
-9q21,+10q22~qter,+11q14~qter,+12q13,+13q14~qter,-14q11.2,-14q24~qter,
-16p12~p13.1,+18q12~qter,-21q11.2~q21



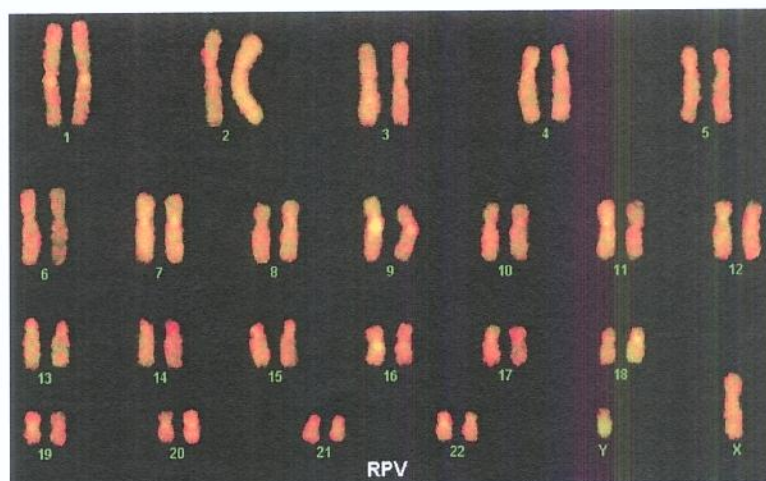
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



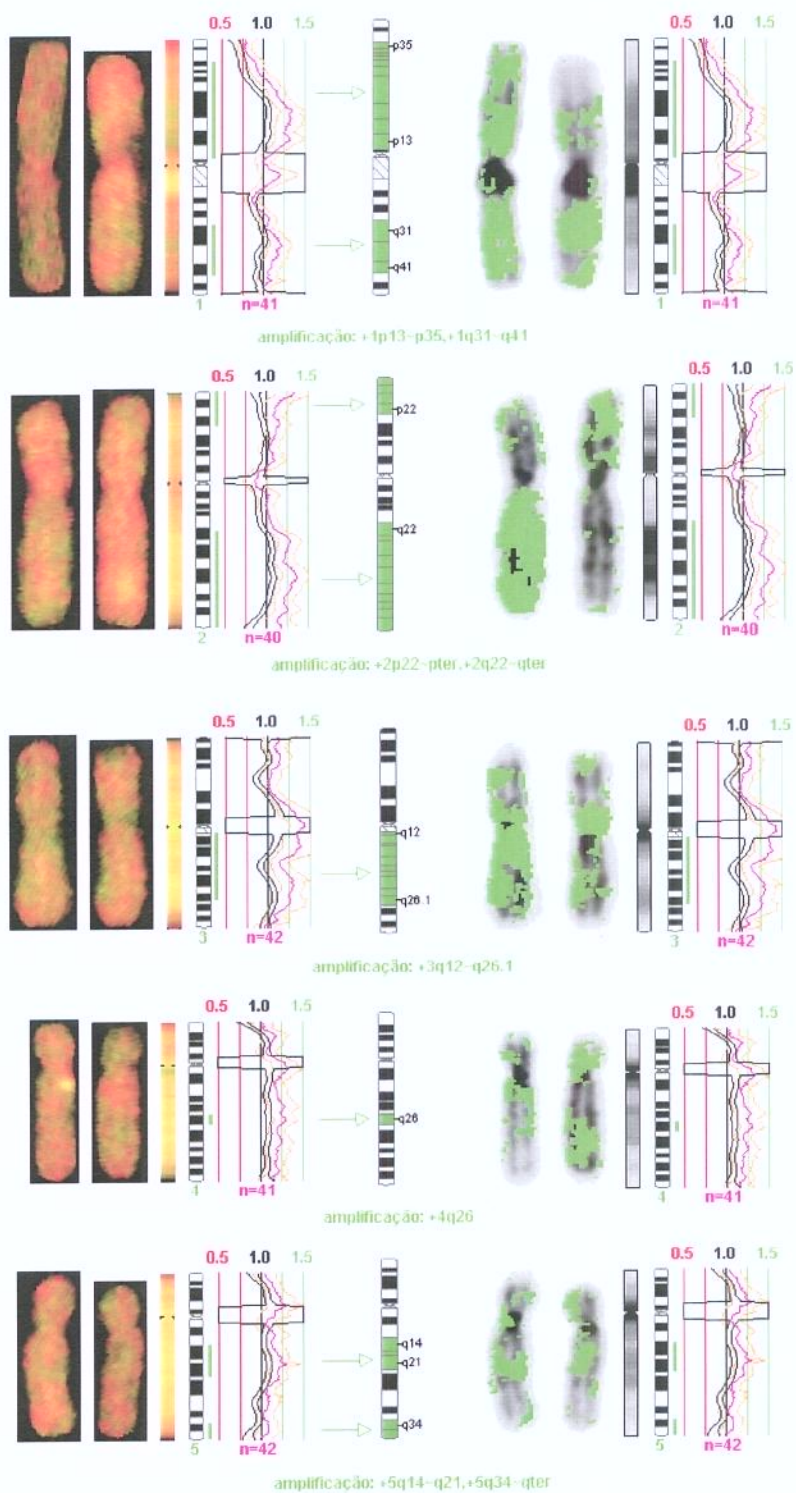
Cariótipo DAPI invertido



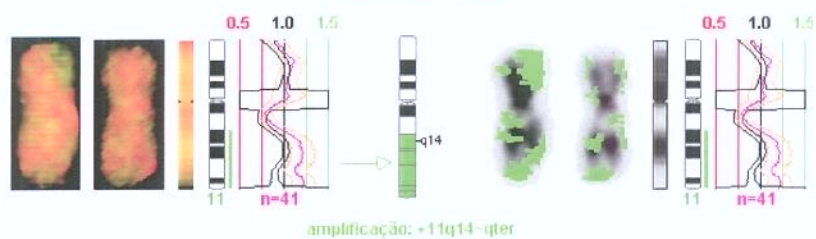
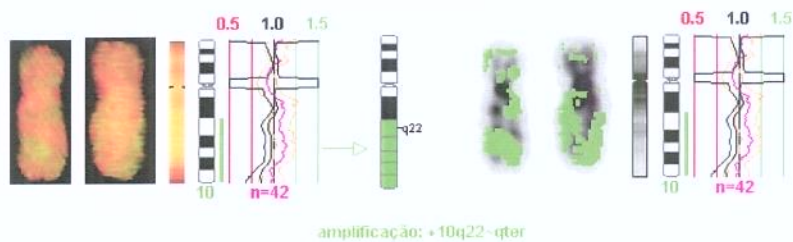
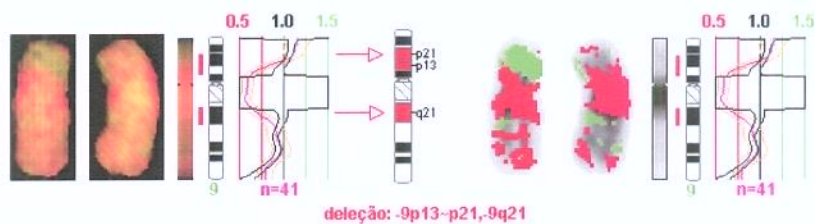
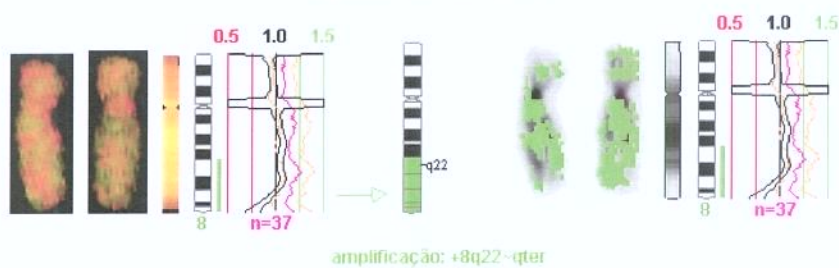
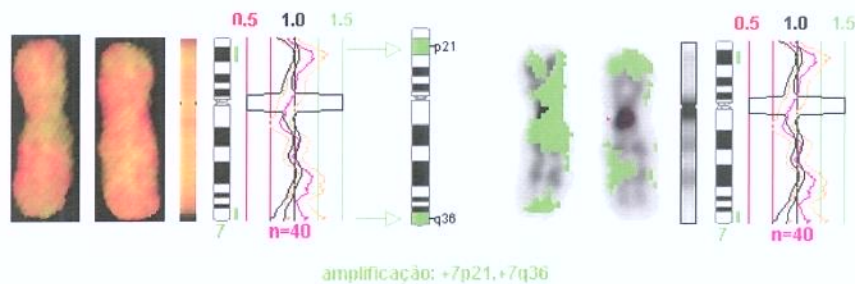
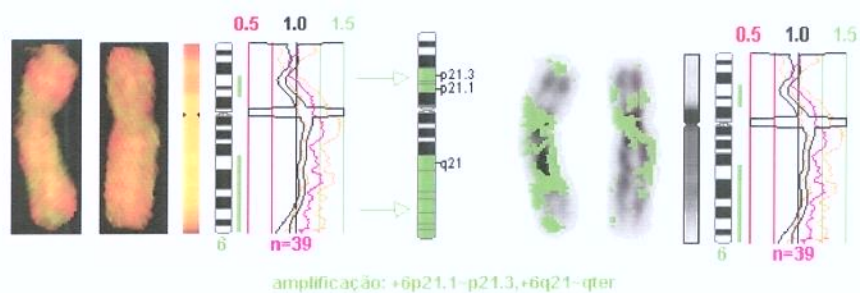
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Caso 35: RPV

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

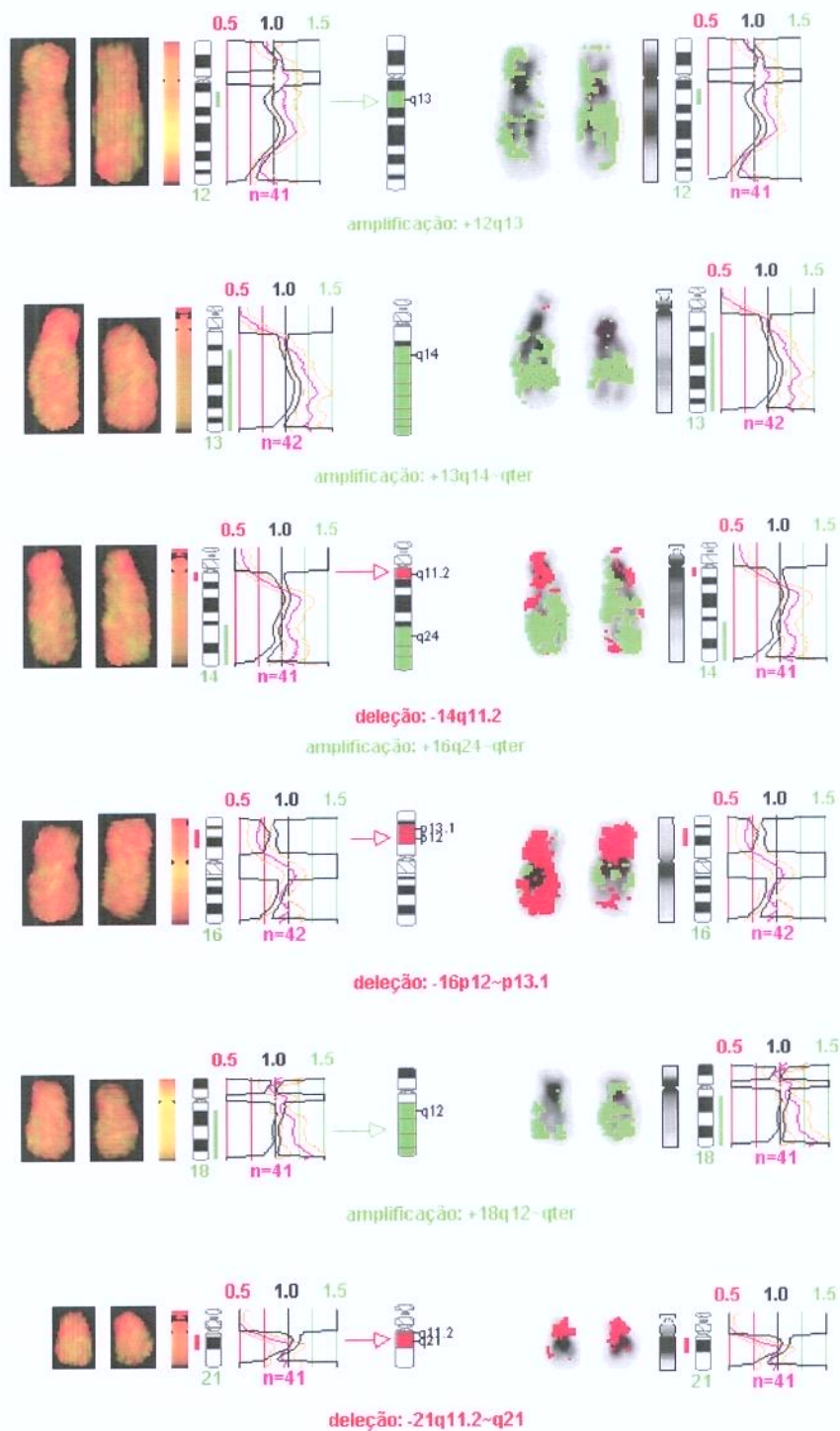


Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)

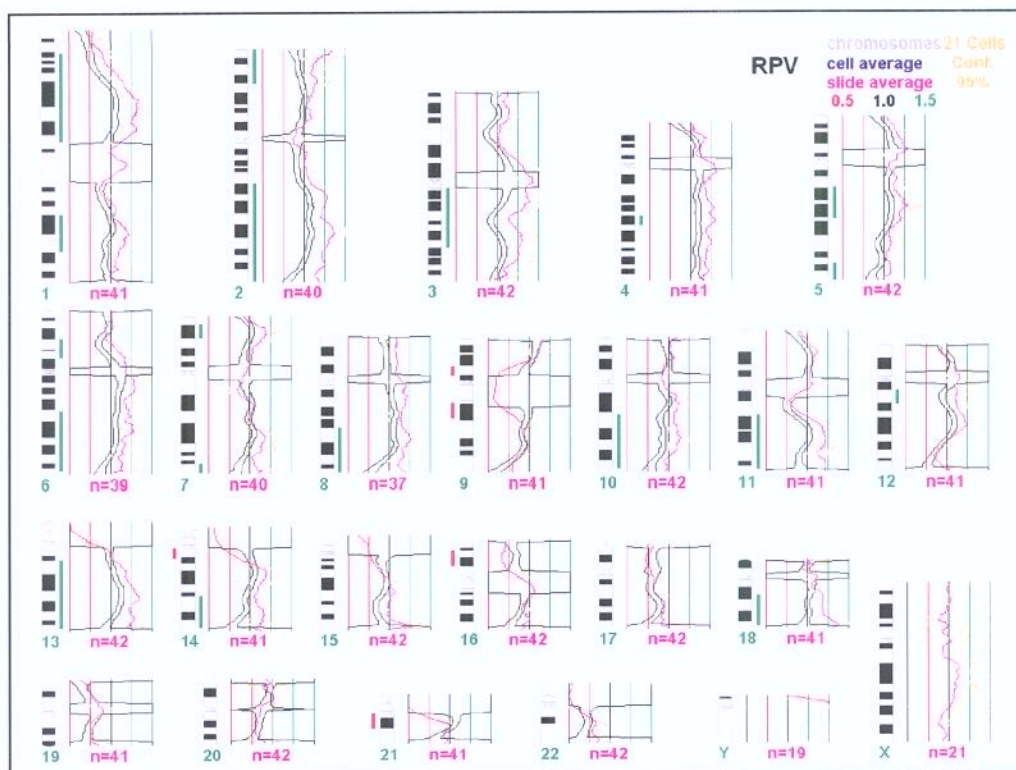


Caso 35: RPV

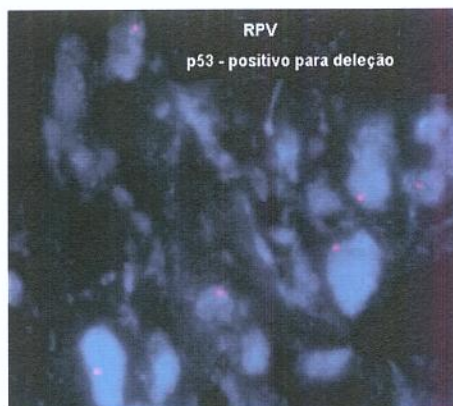
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 35: RPV



Profile



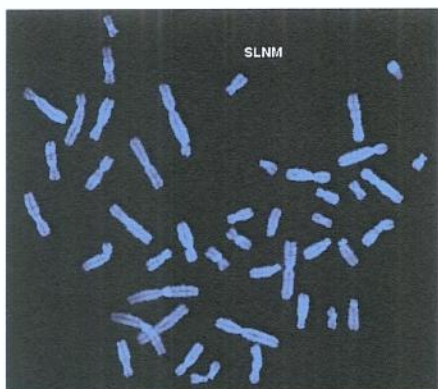
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



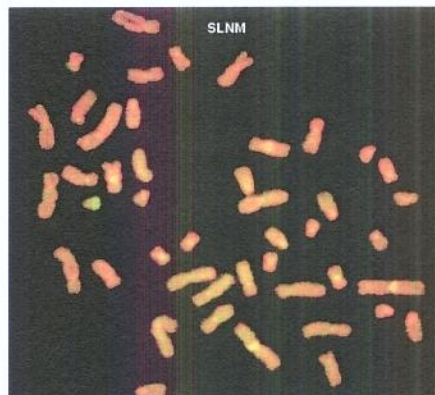
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 36: SLNM

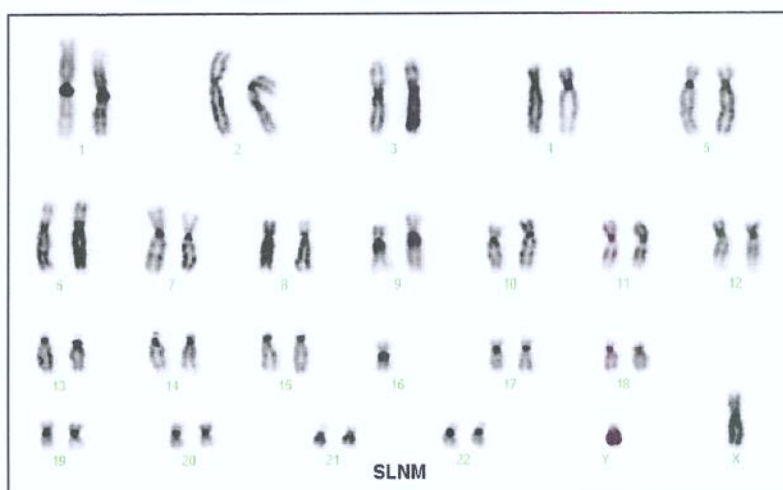
Resultado: +1p31~p32,+1q24~q32,+3p21~p23,+5q14~q33,+6p11.2~p21.2,+6q26~qter,
+8q24.1~qter,-9q21,+9q32~qter,+11p14,-14q11.2,+16q13~q21,-21q11.2



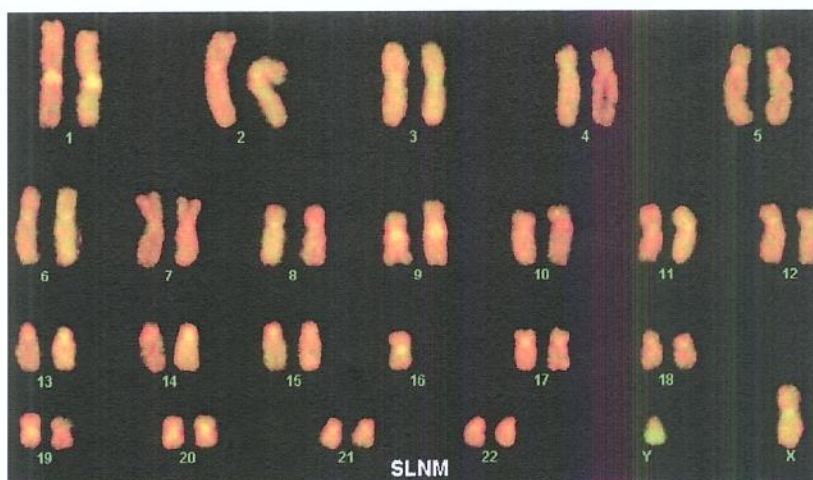
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

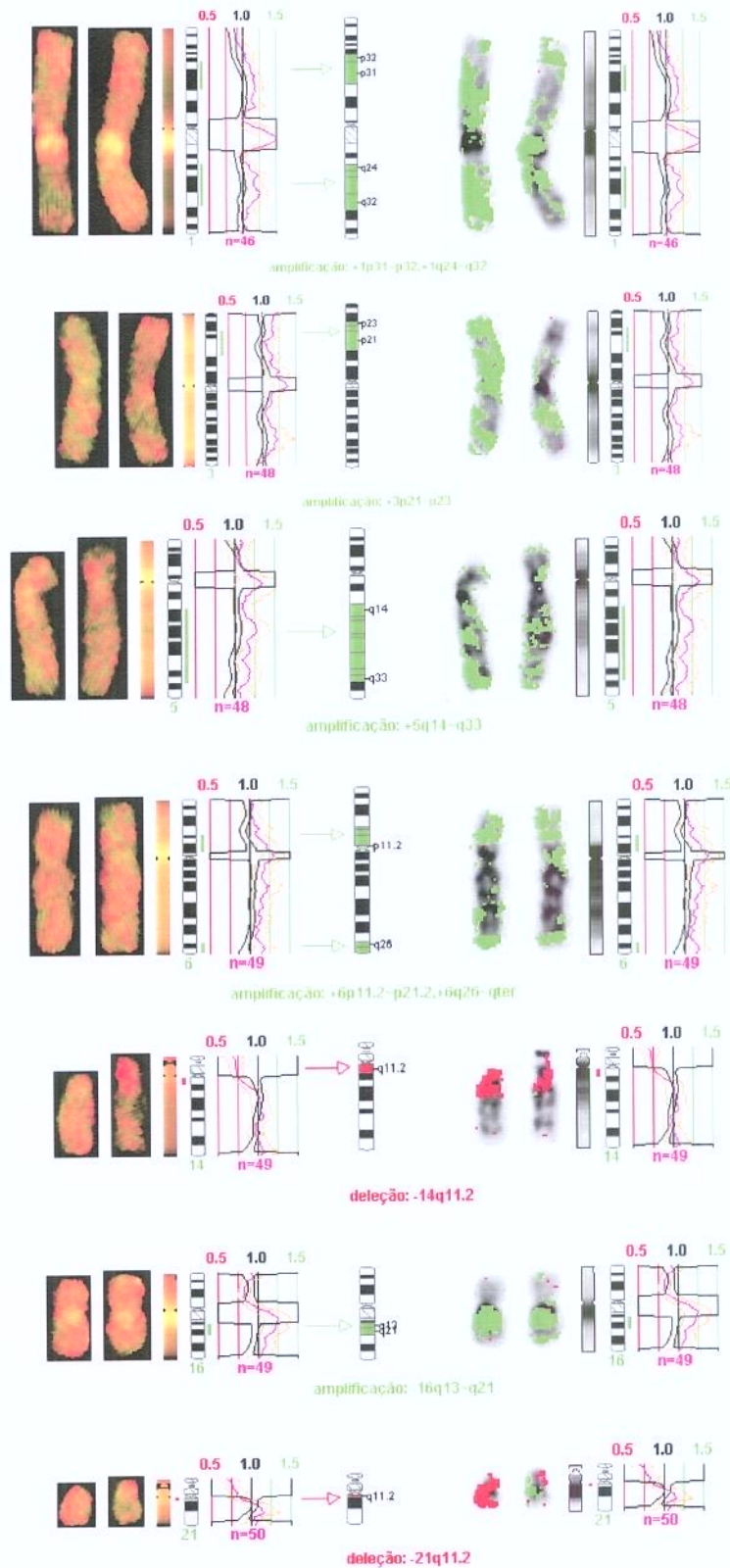


Cariótipo DAPI invertido

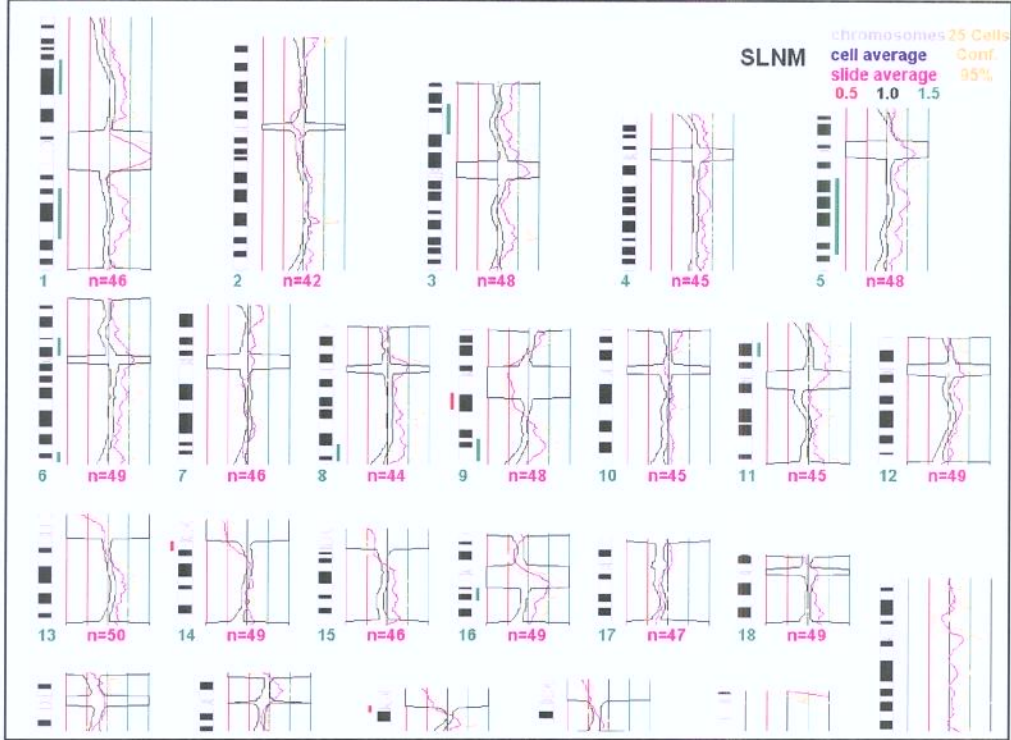


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 36: SLNM



Profile



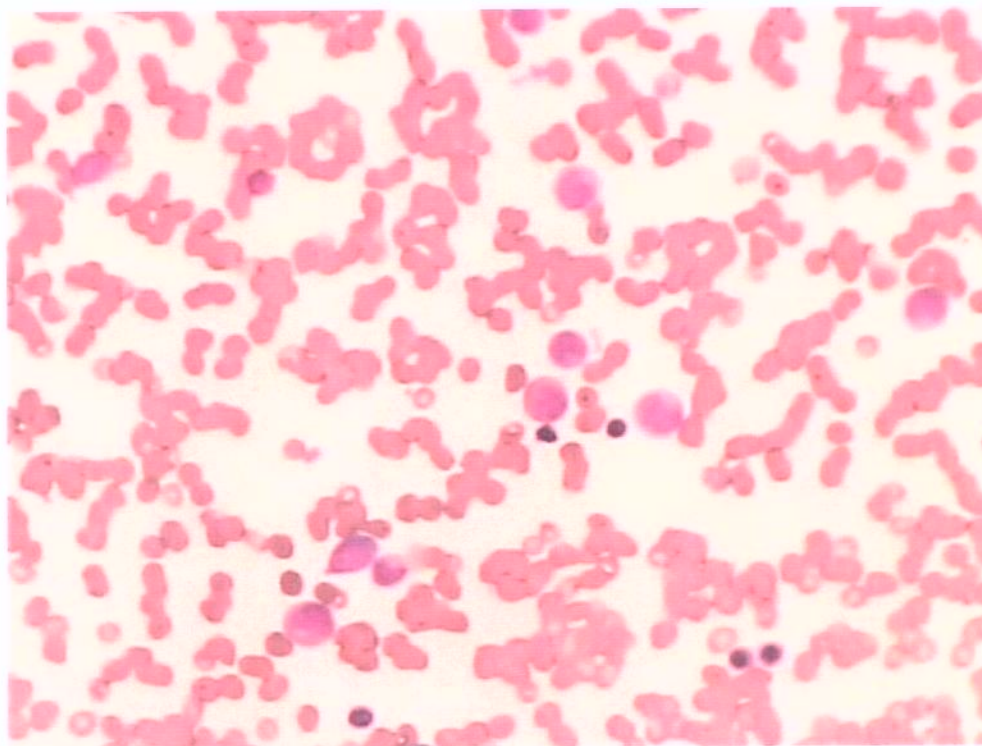
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 36: SLNM

Mielograma da 2ª neoplasia (LMA)



Mielograma da 2ª neoplasia (LMA)



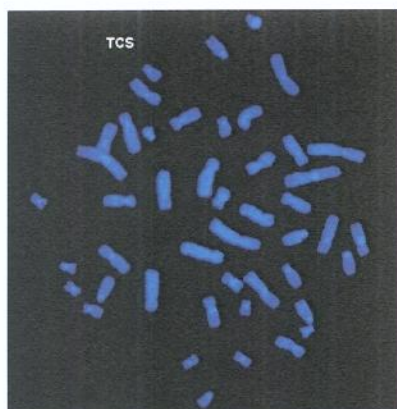
FISH para pesquisa da deleção do gene p53 no sangue periférico



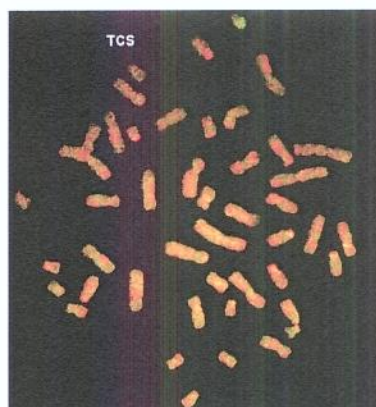
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1 no sangue periférico

Caso 37: TCS

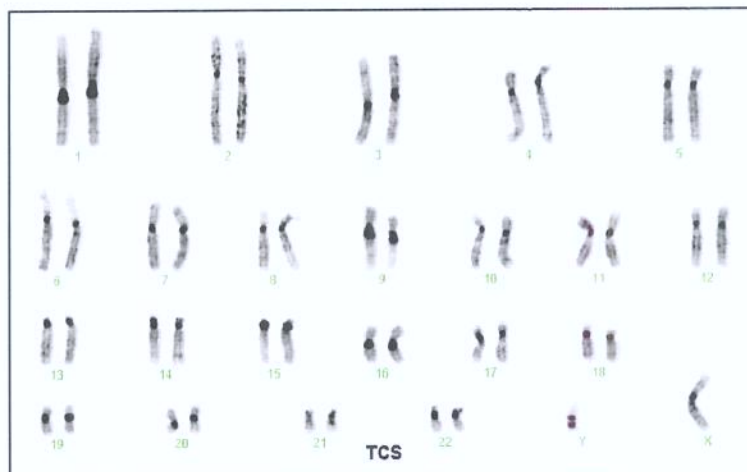
Resultado: +1p21~q43,+3q13.1,+4q32~q34,+6q13,-6q25~qter,+12p12,+13q22~q32,
-16p13.1,+17q24~qter



Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

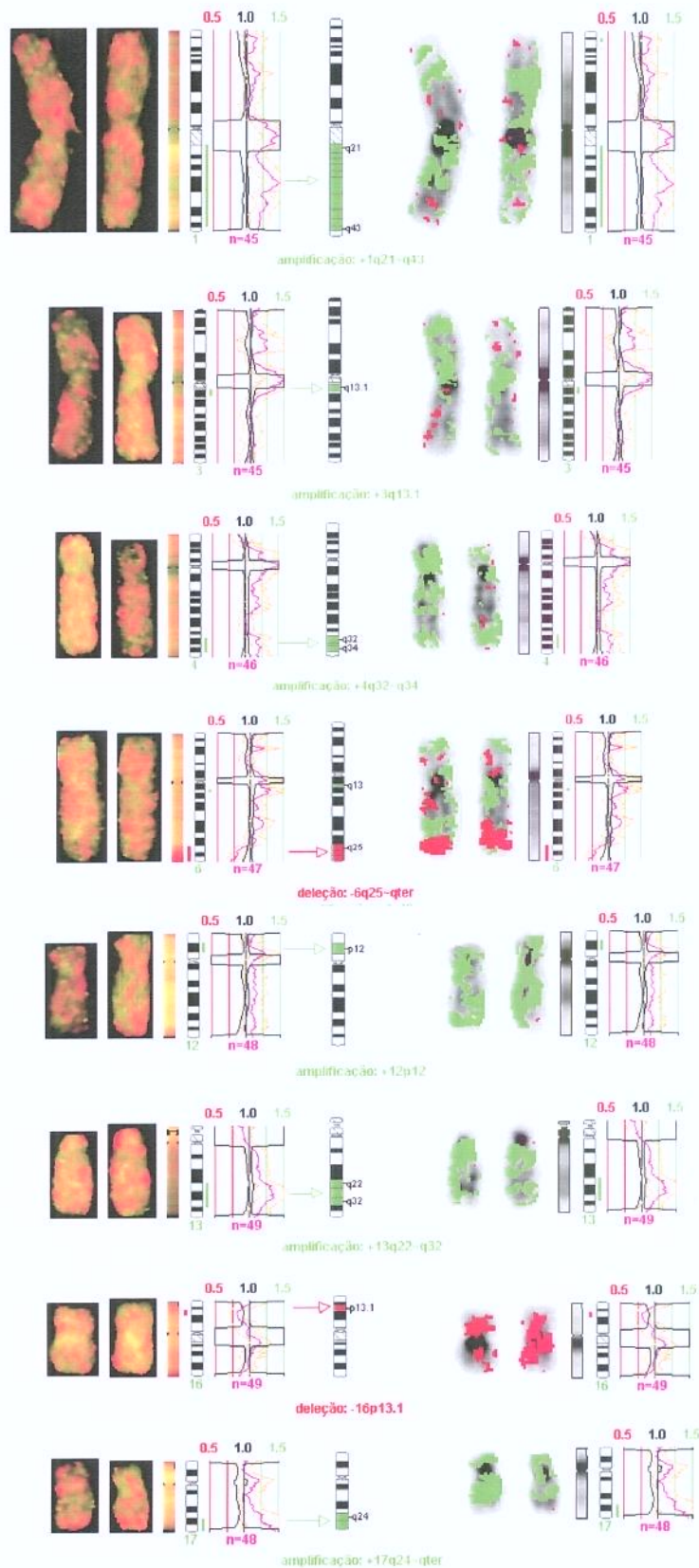


Cariótipo DAPI invertido

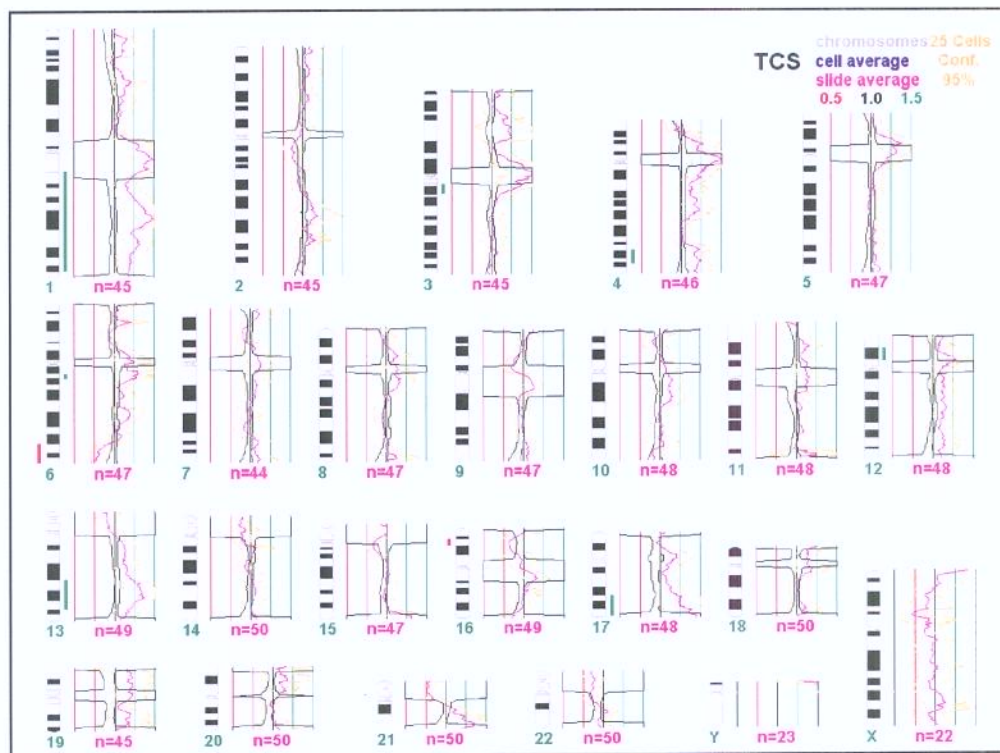


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



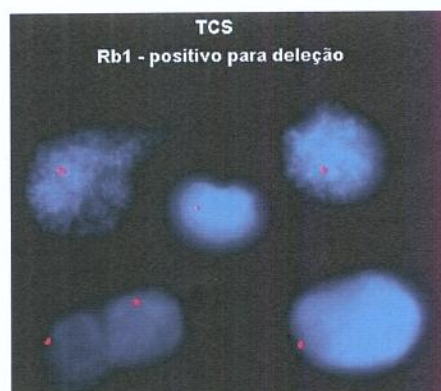
Caso 37: TCS



Profile



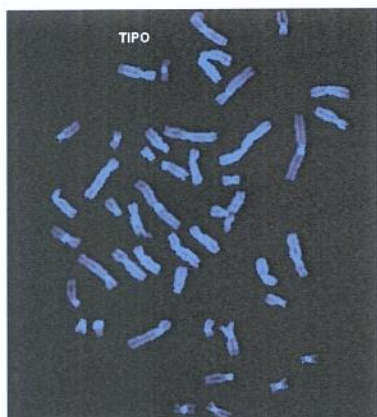
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



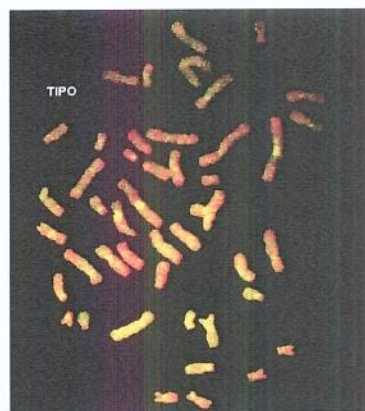
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 38: TIPO

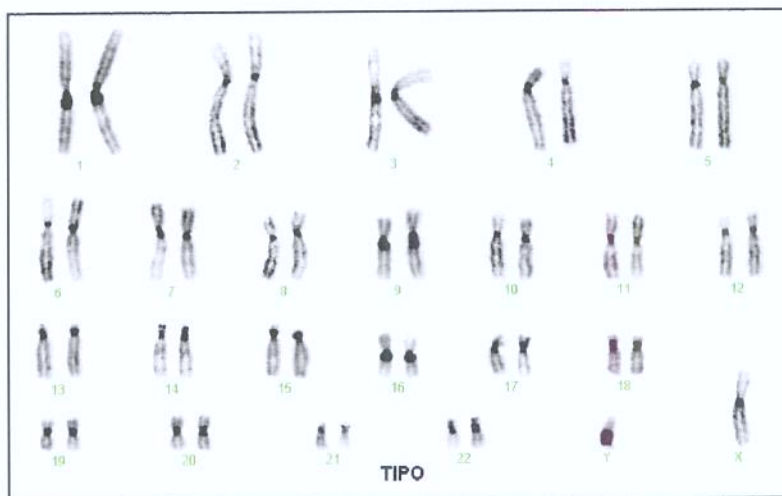
Resultado: +2p21~p24,+2q32~q33,+3p21,+4q23~q26,+5q11.2,+6p12~q23,+8q13,+11p12~p13,+ 11q23 ~ qter,+12q12 ~ 14, -16 p13.1~p13.3, +16q12.2 ~ q13, + 17p11.2 ~ q11.2, +18p11.2~q12,+19p13.1~q13.1,+21q11.2~q21



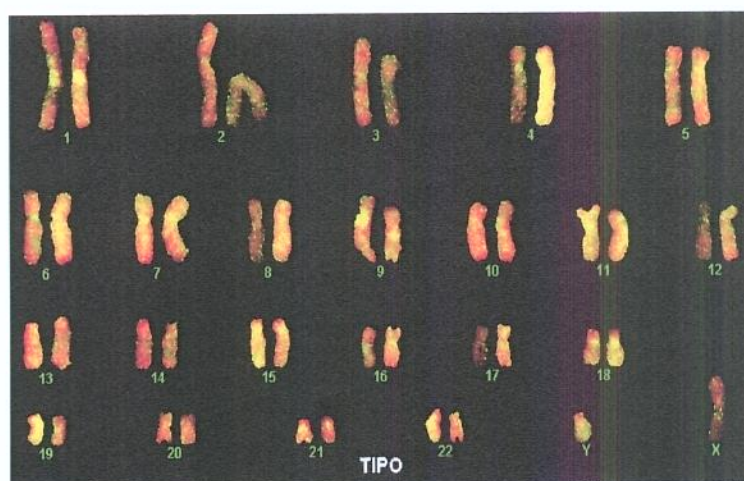
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)



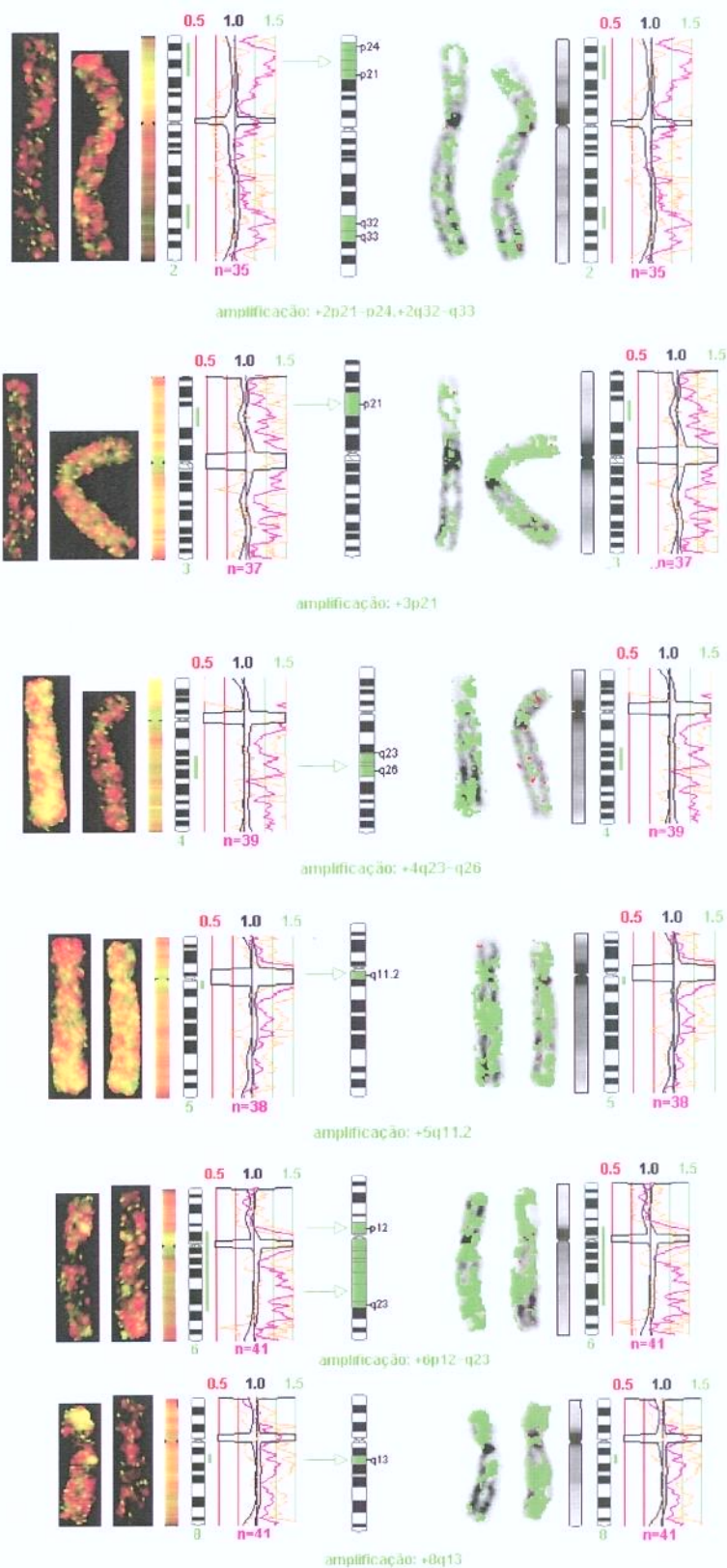
Cariótipo DAPI invertido



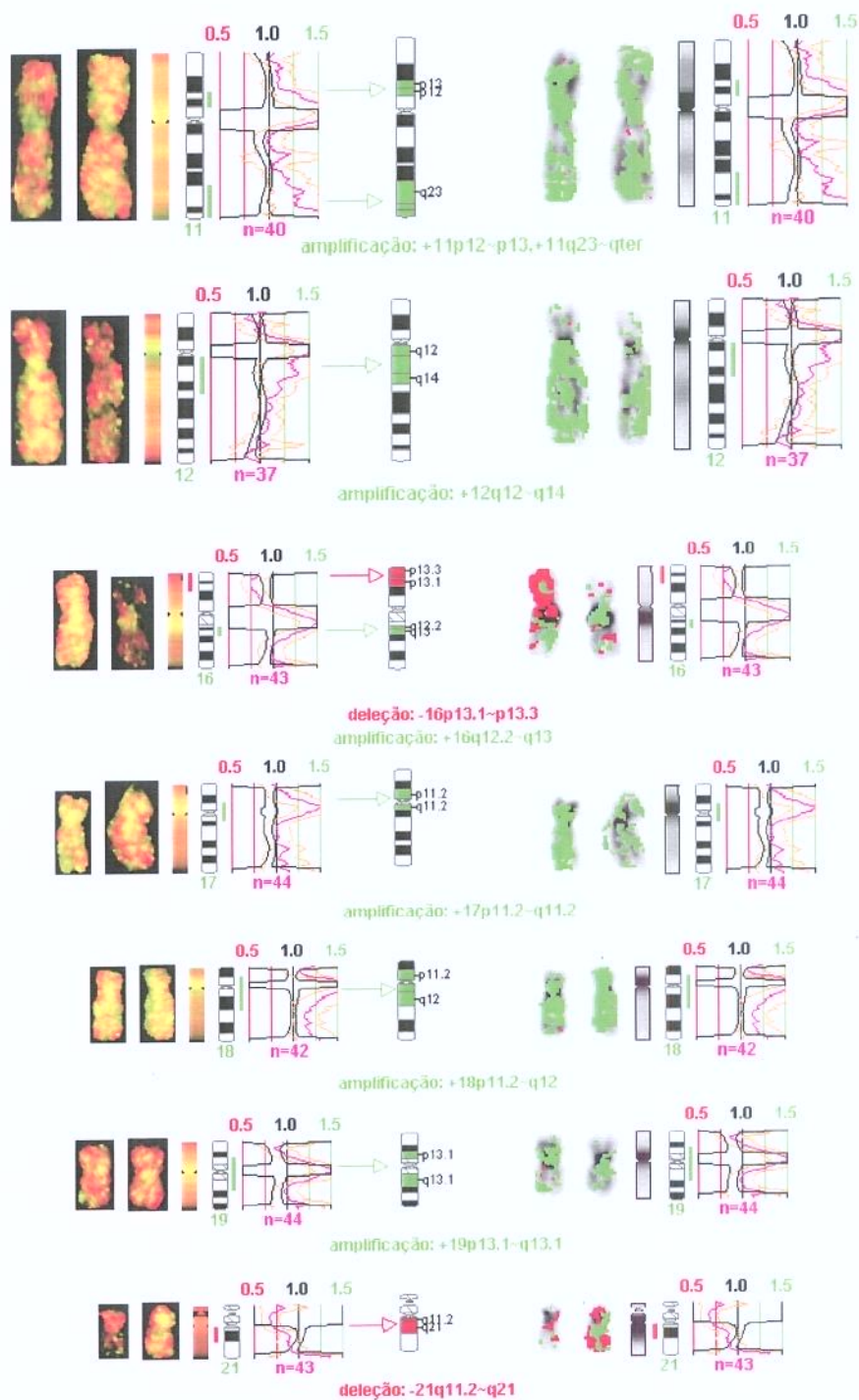
Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Caso 38: TIPO

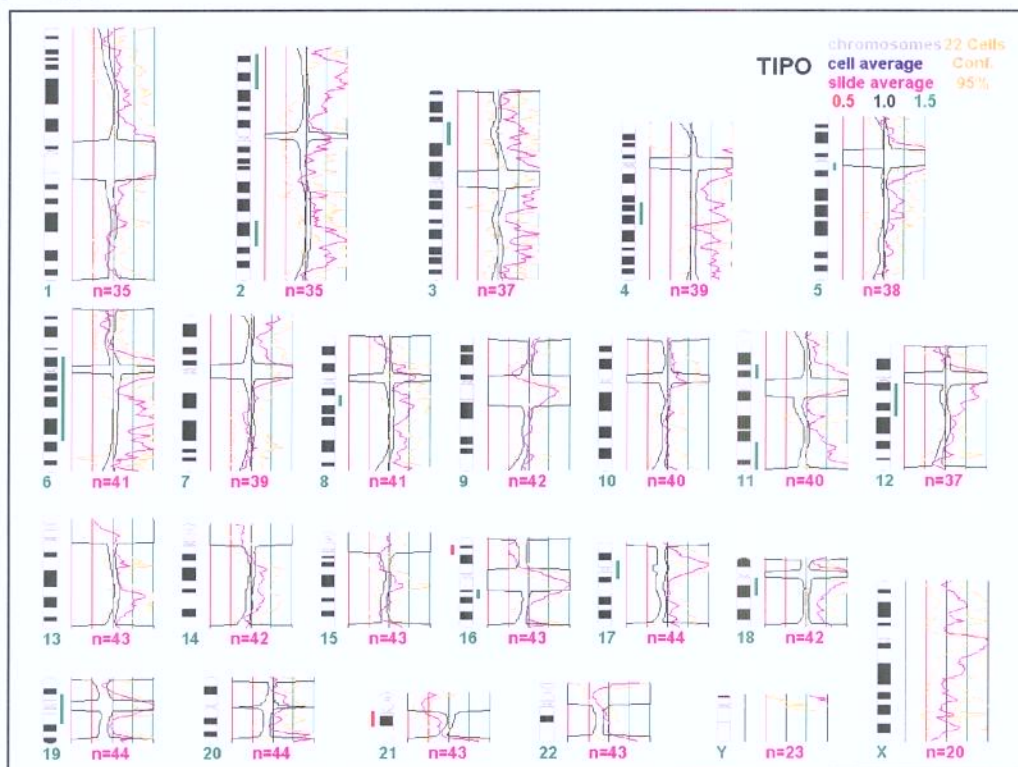
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



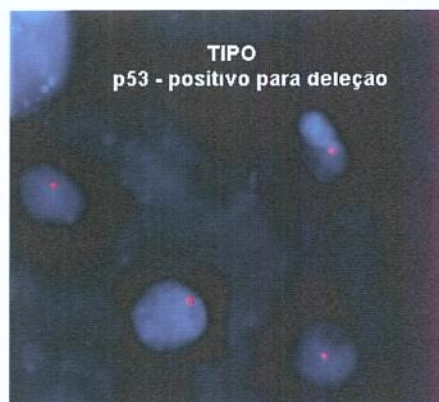
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 38: TIPO



Profile



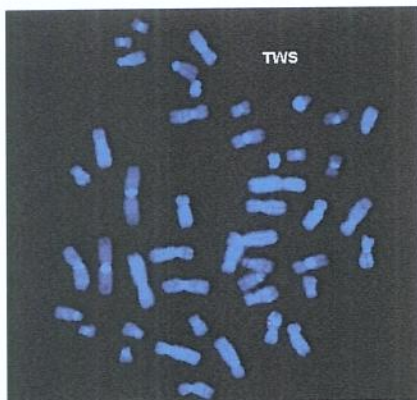
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



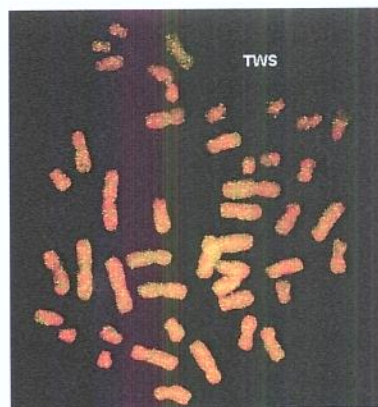
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 39: TWS

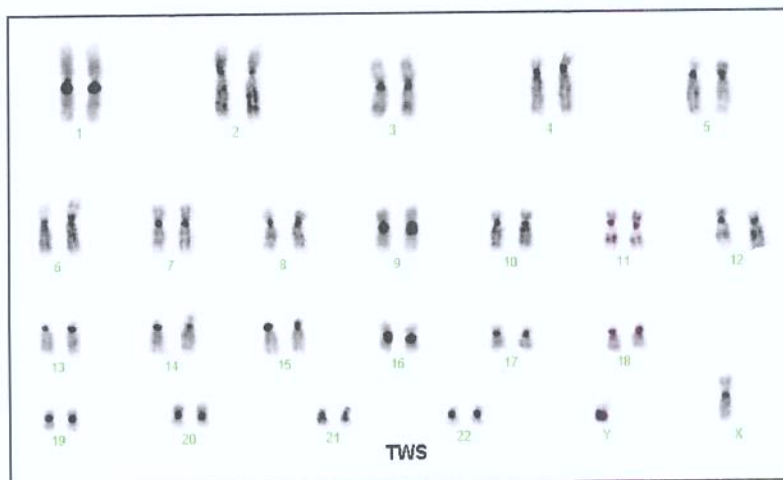
Resultado: +1,+2,+3,+4,+5,+6,+7,+8,+9p13~pter,+9q21~qter,+10p12~pter,+10q,+11,+12p13~q24.1,+13q,+14q,+15q14~qter,+16q12.2~qter,+17,+18,+19p13.2~q13.3,+20,+21q



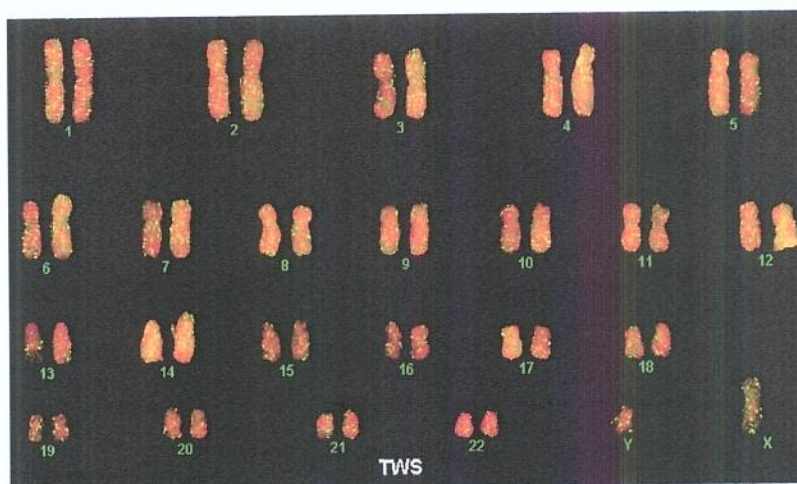
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

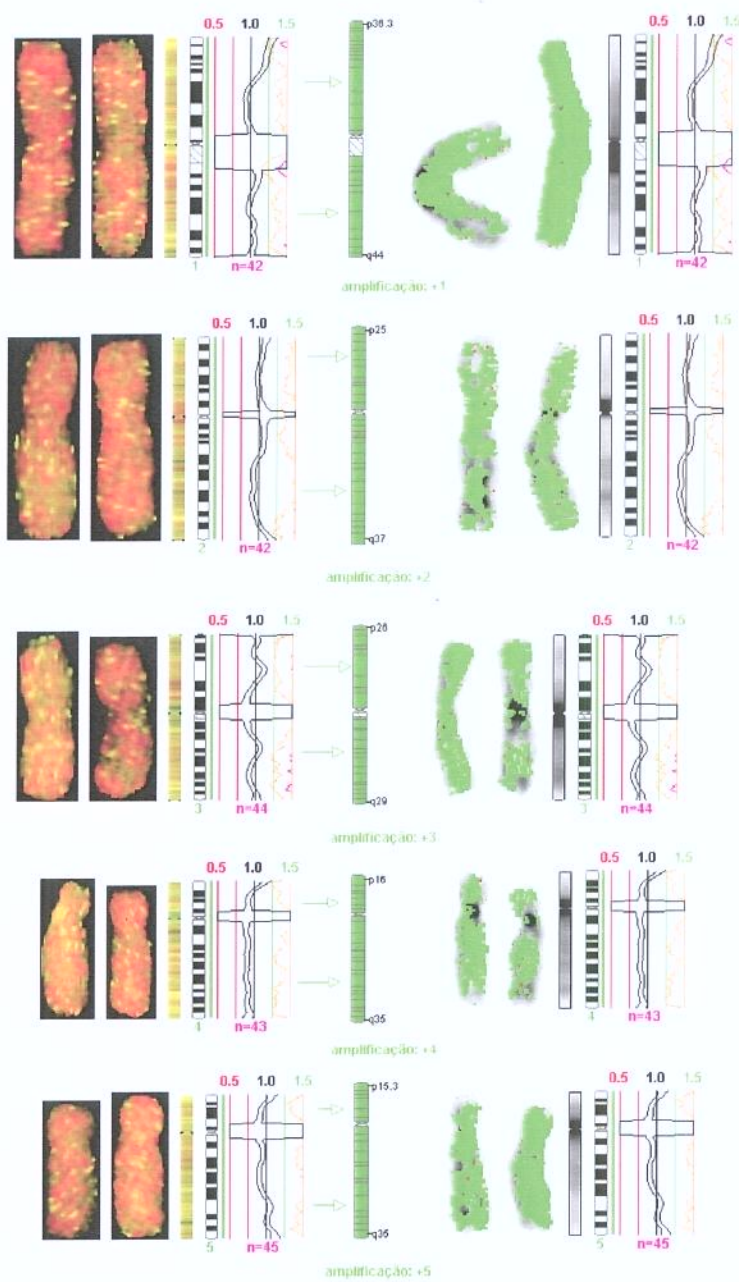


Cariótipo DAPI invertido

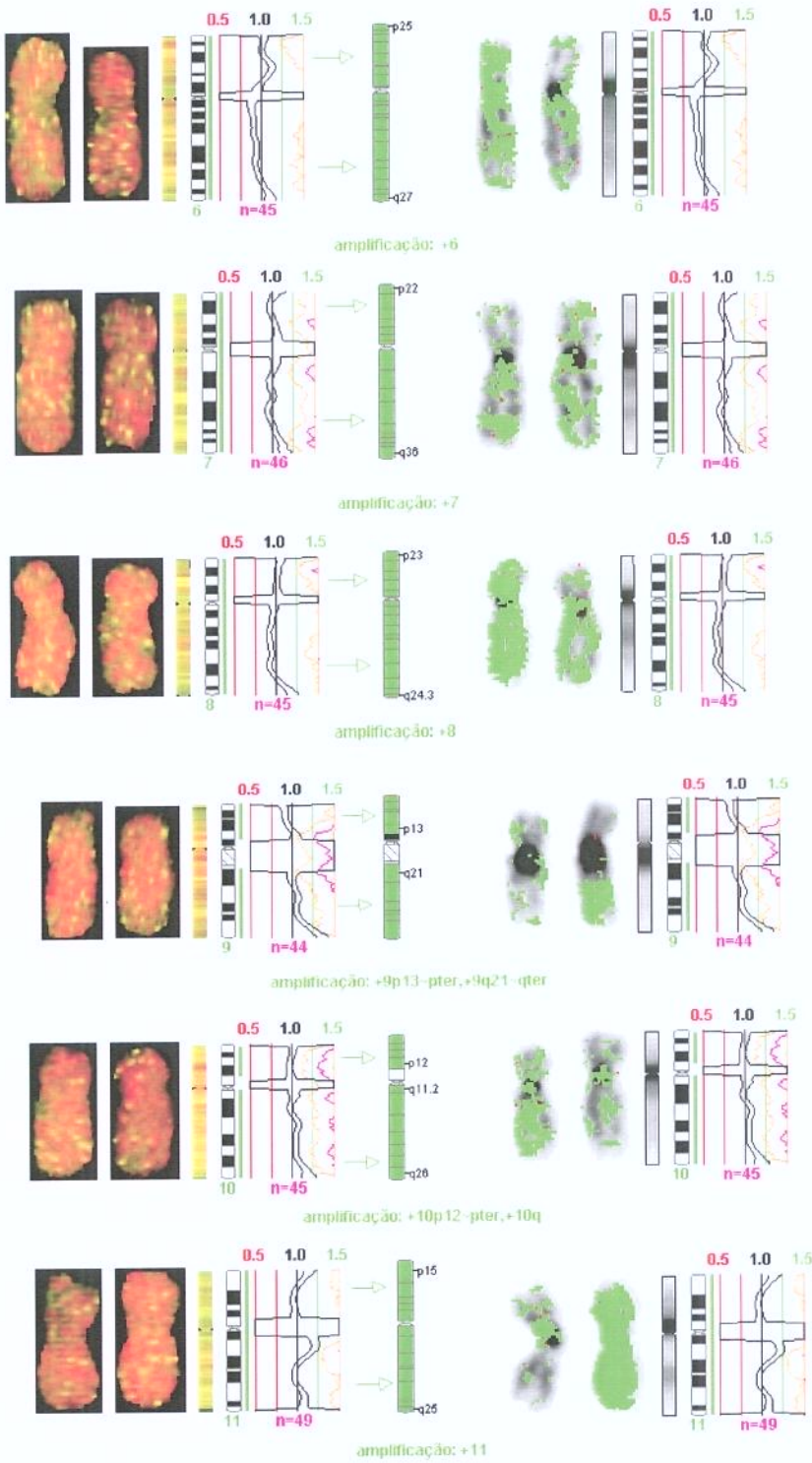


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

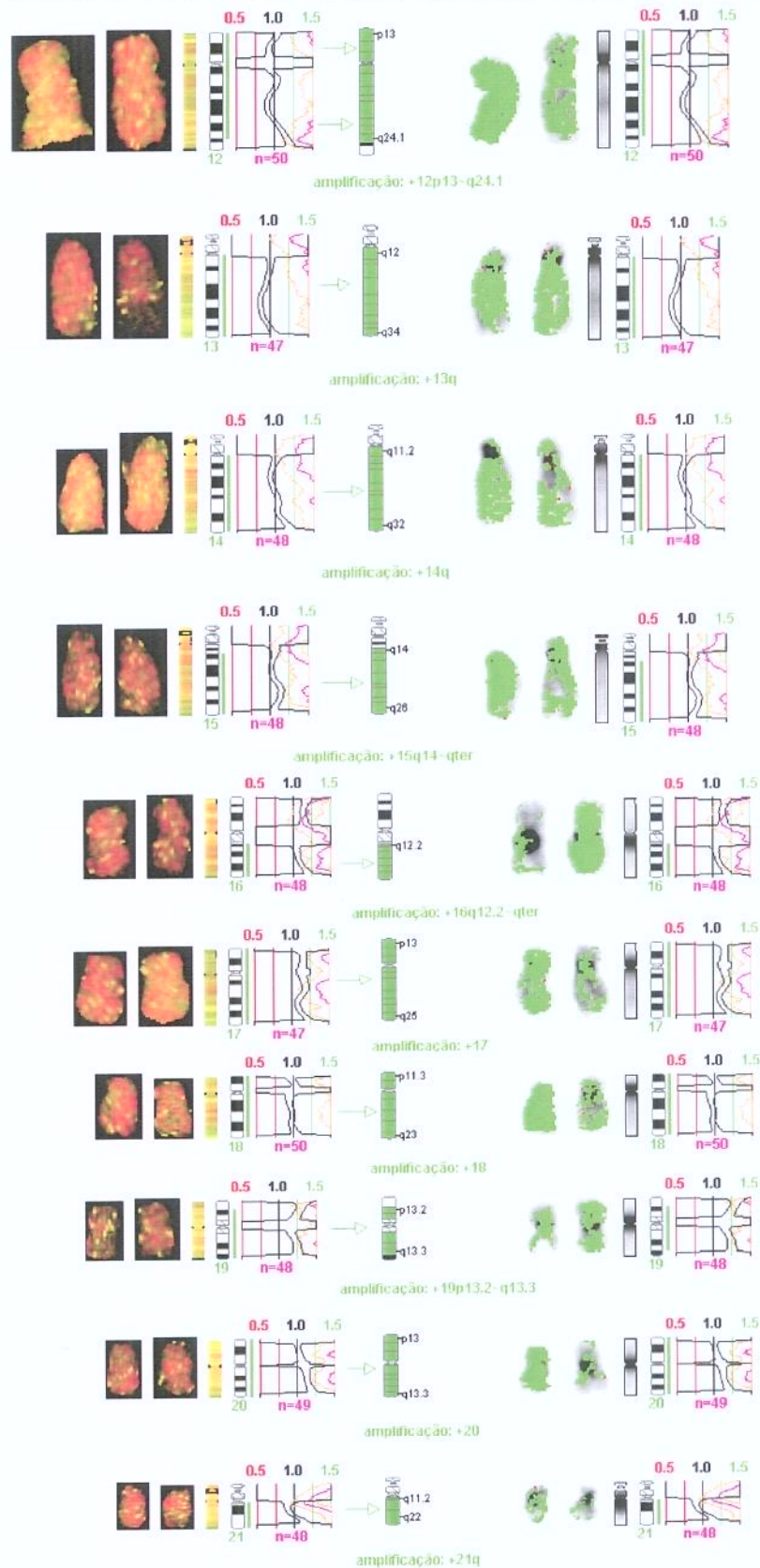
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



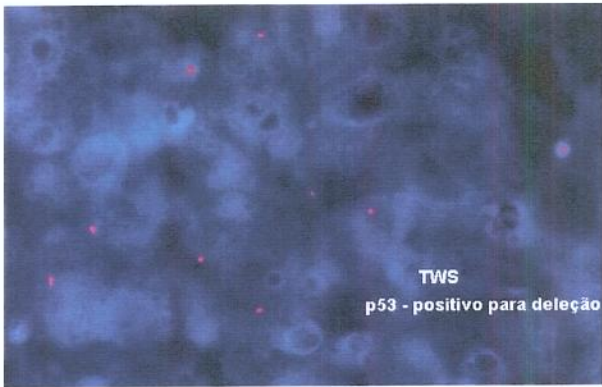
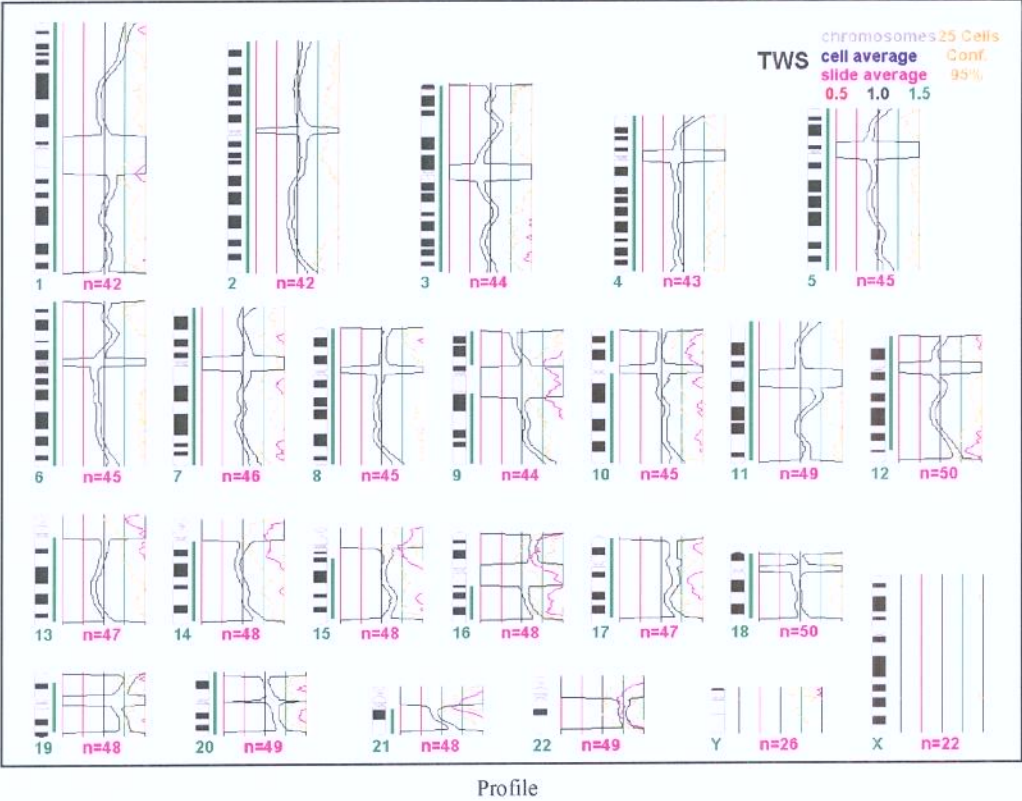
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



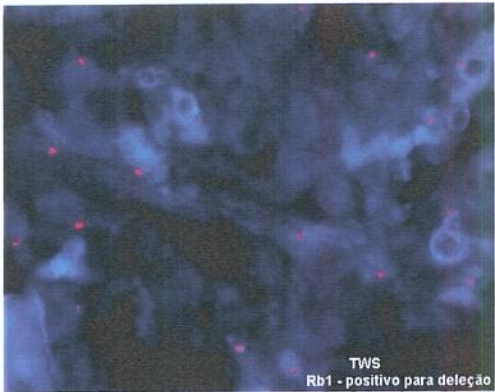
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 39: TWS



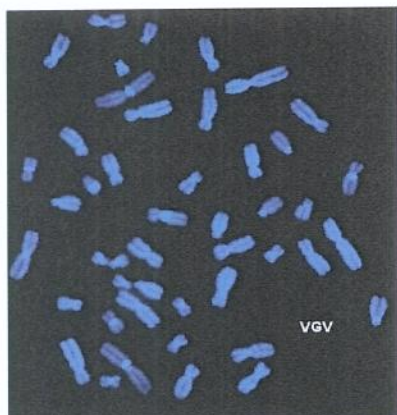
FISH para pesquisa da deleção do gene p53



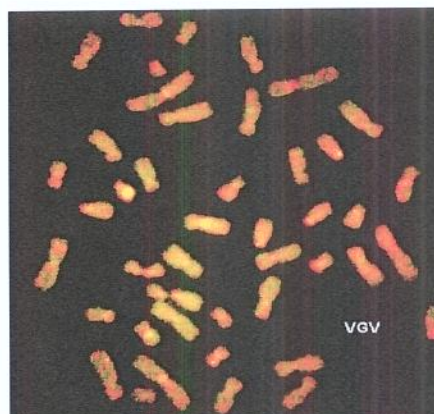
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 40: VGV

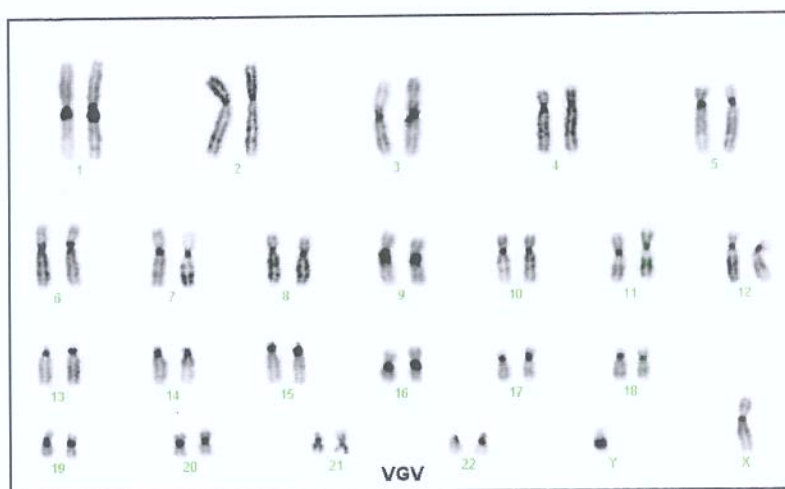
Resultado: +1q31~q32,+2p32,+3p21~q26.3,+4q13~q33,+5q34,+6p21.3~q16,+7p21,
+8p12~p22,+9q31,+12q13~q22,+13q21,-14q11.2~q12,-16p11.2~p12,
+16q12.2~qter,+18q12~qter,-21q11.2,-22q11.2



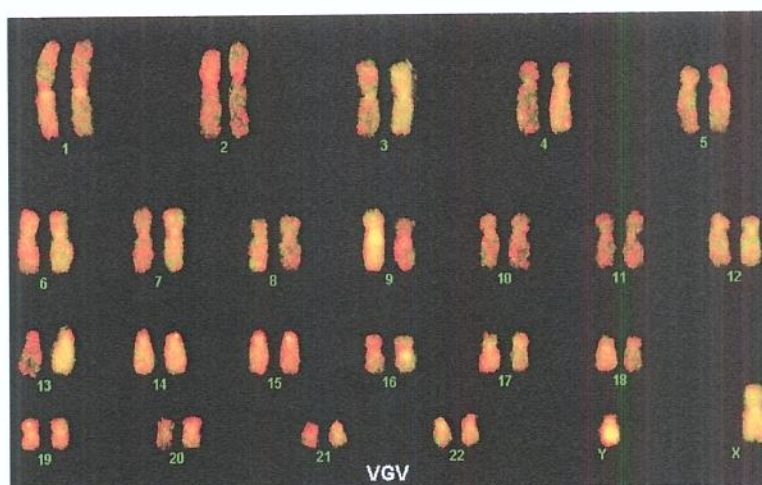
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

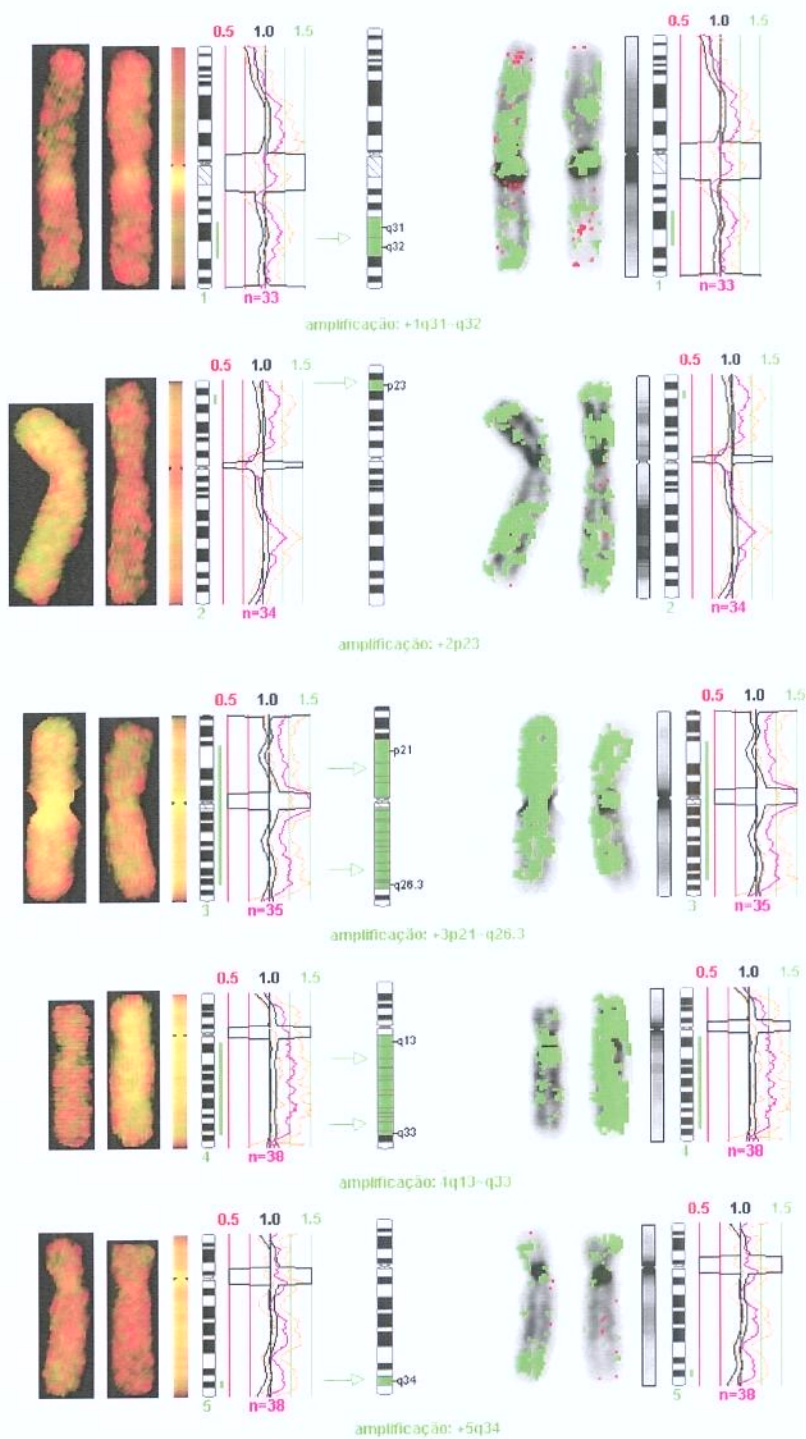


Cariótipo DAPI invertido

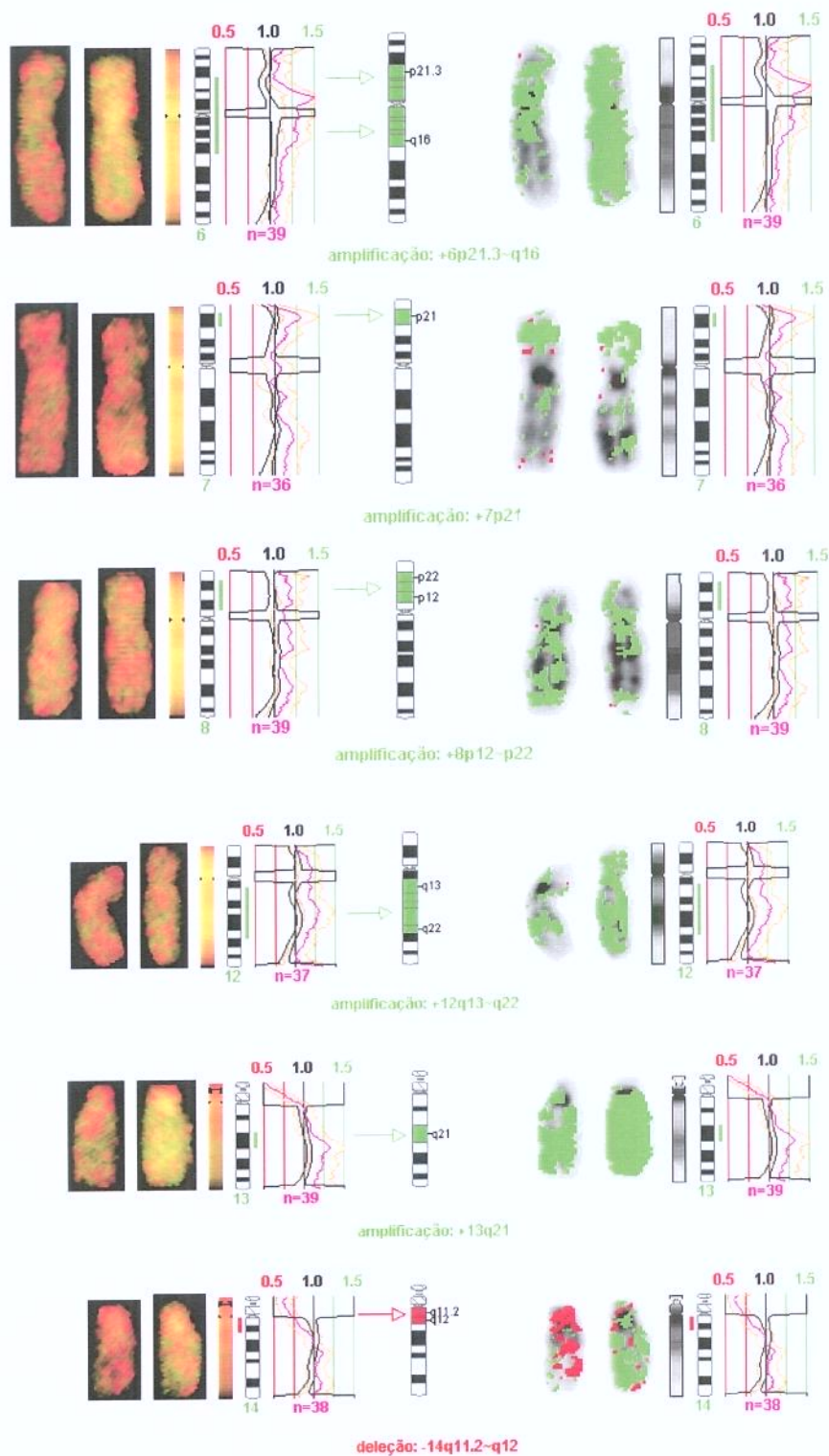


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

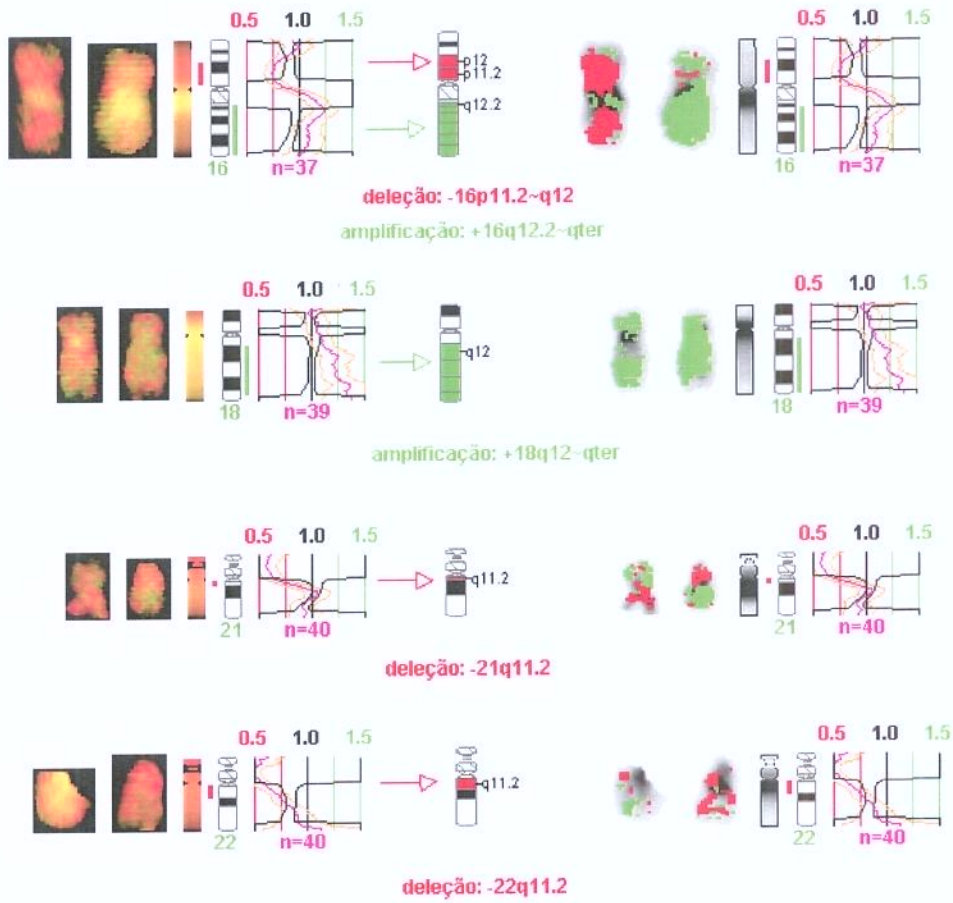
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



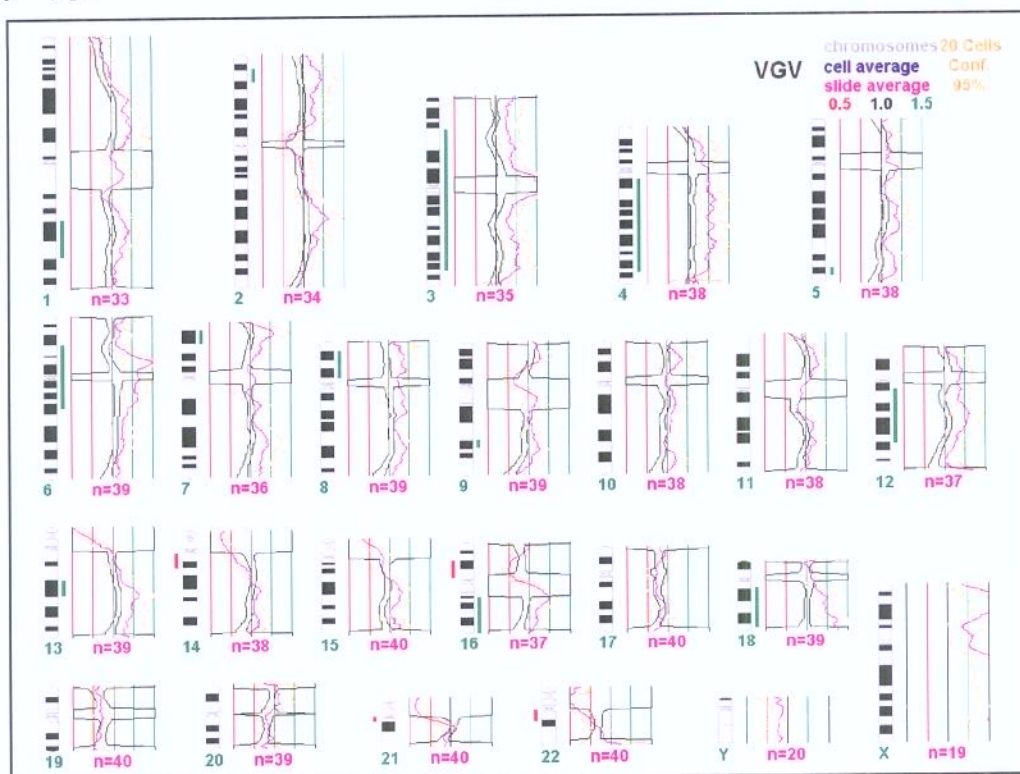
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



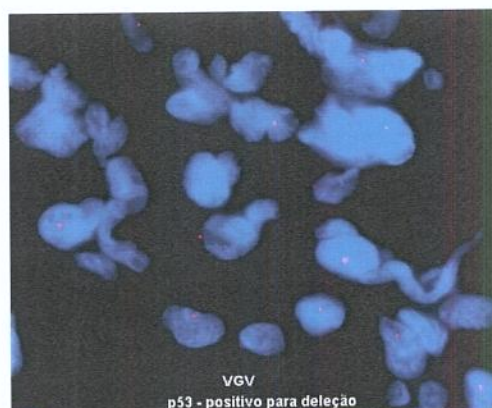
Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



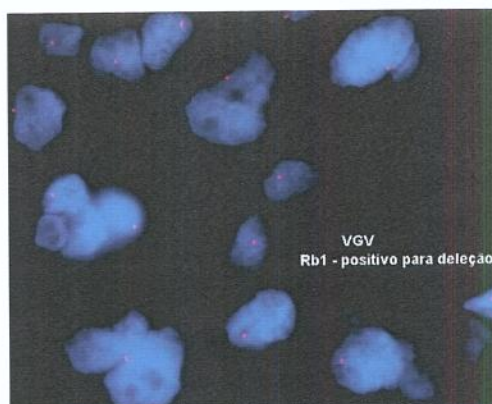
Caso 40: VGV



Profile



FISH para pesquisa da deleção do gene p53



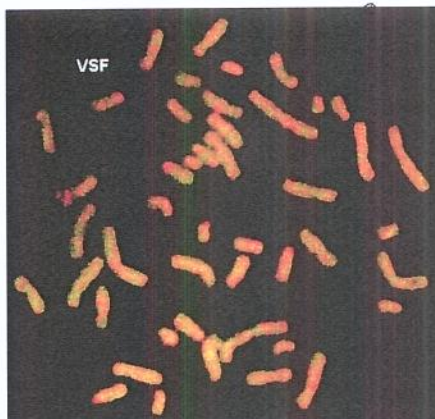
FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1

Caso 41: VSF

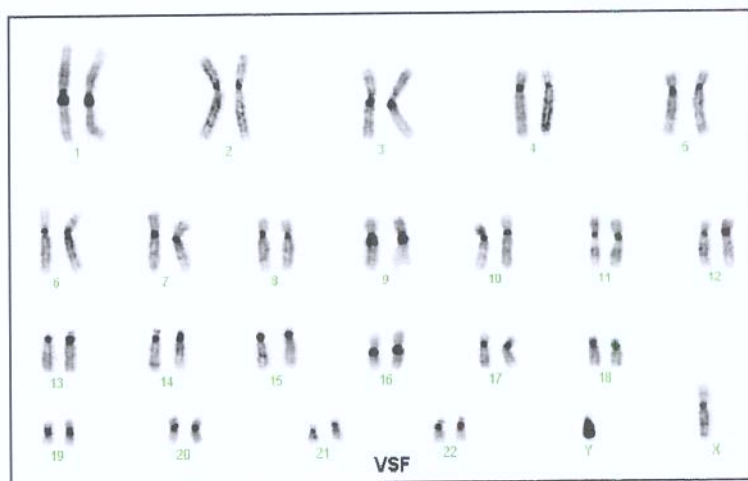
Resultado: +2p23~pter,+3q23,-14q11.2~q12,+14q32,-16p11.2~p13.1,-21q11.2~q21



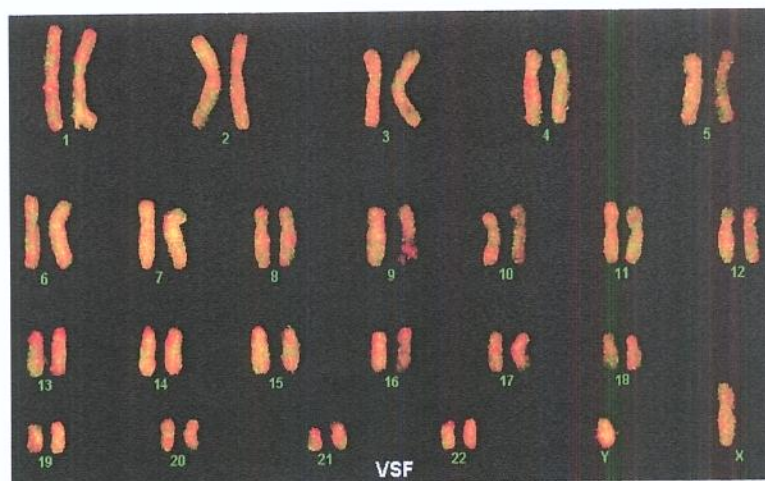
Metáfase corada DAPI



Metáfase DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

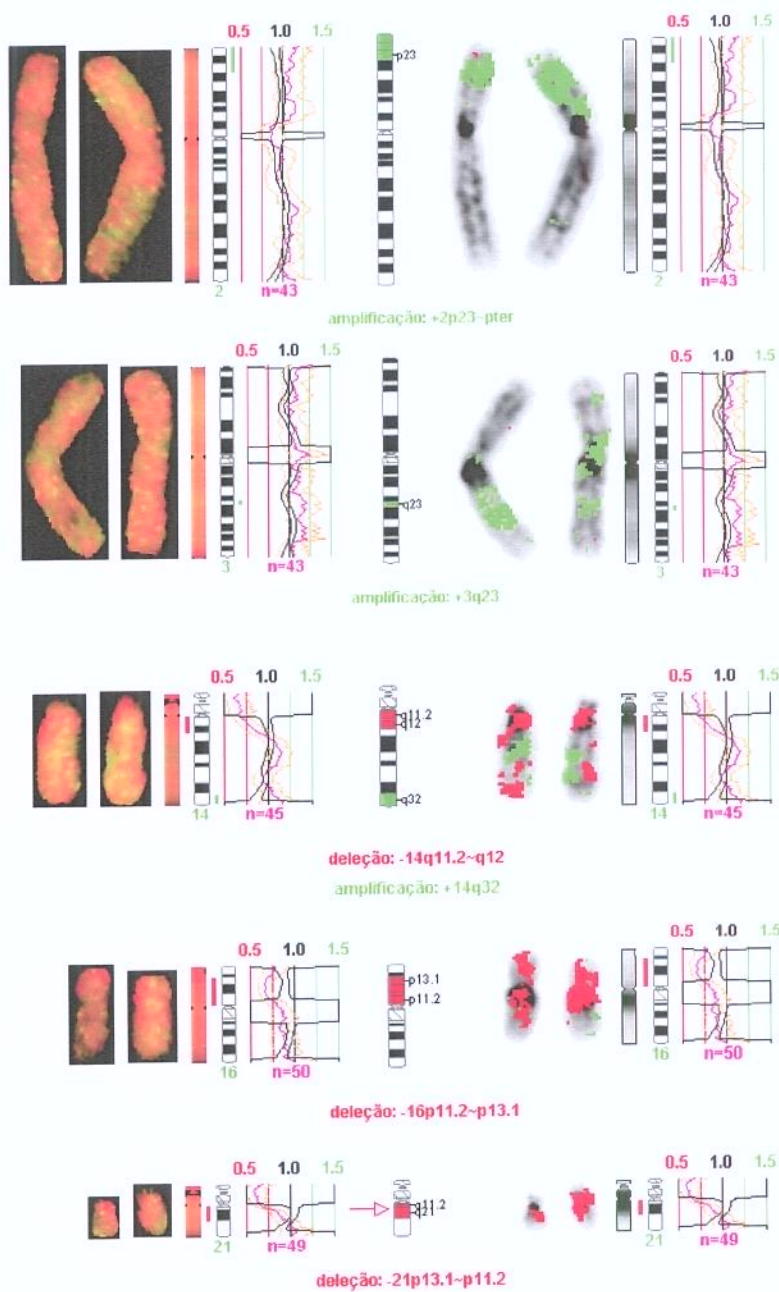


Cariótipo DAPI invertido

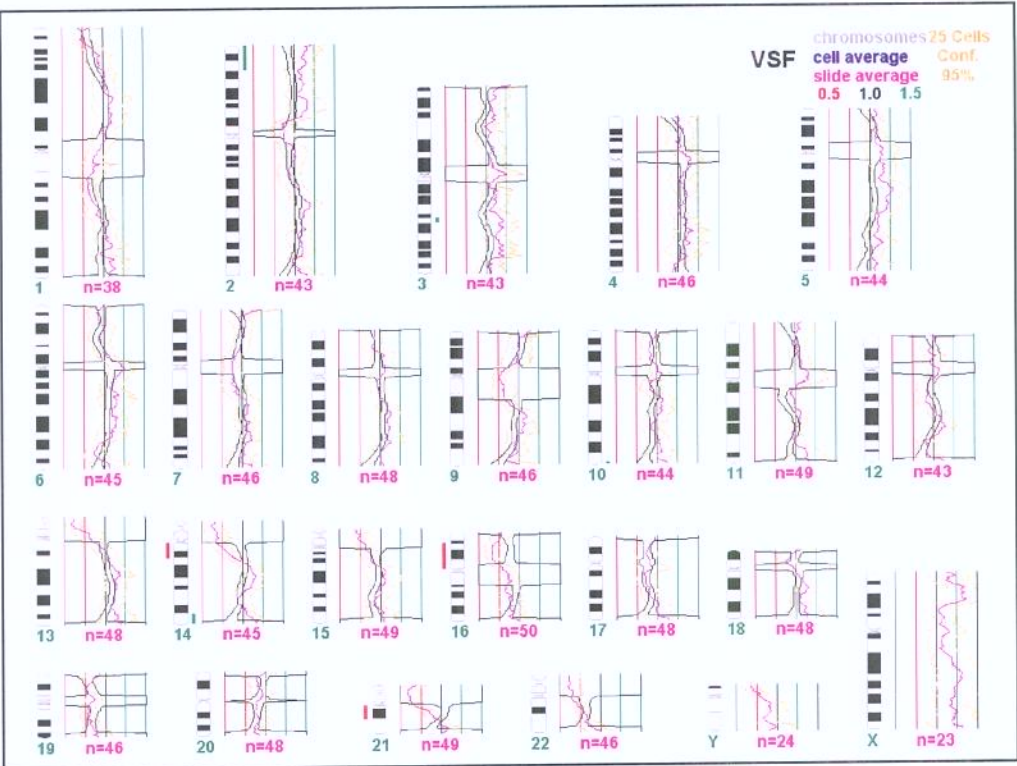


Cariótipo DNA referência (TRICT) x DNA teste (FITC)

Razão do CGH
(intensidade relativa do DNA teste em relação ao DNA referência)



Caso 41: VSF



Profile



FISH para pesquisa da deleção do gene p53



FISH para pesquisa da deleção do gene Rb1