JOSÉ CARLOS BARBI-GONÇALVES

SARCOMA DE EWING E TUMOR NEUROECTODÉRMICO PRIMITIVO ÓSSEO. CORRELAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E FATORES PROGNÓSTICOS.

ORIENTADORA PROF.DRA. **ELIANE MARIA INGRID AMSTALDEN**

Dissertação de tese de mestrado apresentada
à Faculdade de Ciências Médicas

DEPTO. DE ANATOMIA PATOLÓGICA
UNICAMP
1998

UNIDADE BC
N.º CHAMADA
36699
229/99
[x]
R$ 11,00
06/03/99
N.º CPD

CM-00121446-0

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

B236s

Barbi-Gonçalves, José Carlos
Sarcoma de Ewing e tumor neuroectodérmico primitivo ósseo: correlação histopatológica, imuno-histoquímica e fatores prognósticos / José Carlos Barbi-Gonçalves. Campinas, SP : [s.n.], 1998.

Orientador : Eliane Maria Ingrid Amstalden
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Prognóstico. 2. Imunohistoquímica. I. Eliane Maria Ingrid Amstalden. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

Membros:

1. Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden-

2. Prof. Dr. Ademar Lopes -

3. Prof. Dr. José Vassallo -

Curso de pós-graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 17.12.1998

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS ii

RESUMO

1. INTRODUÇÃO
    1.1. Sarcoma de Ewing 01
        1.1.1 Achados Clínicos 02
        1.1.2 Achados de Imagens 03
        1.1.3 Aspecto Macroscópico 05
        1.1.4 Aspecto Microscópico 06
        1.1.5 Aspectos Imunohistoquímicos 08
        1.1.6. Diagnóstico Diferencial 09
        1.1.7 Tratamento e Prognóstico 11

    1.2. Tumor Neuroectodérmico Primitivo (PNET) 13
        1.2.1 Aspectos Clínicos 14
        1.2.3 Aspectos Microscópicos 16
        1.2.4 Aspectos Imuno-hiostoquímicos 17
        1.2.5 Aspectos Ultraestruturais 17
        1.2.6 Diagnóstico Diferencial
        18
        1.2.7 Tratamento e Prognóstico 18

    1.3 Justificativa 19

2 OBJETIVO 22

3 MATERIAL E MÉTODOS 24

3.1 Pacientes 24
3.2 Avaliação histopatológica 24
3.2.2 Avaliação histoquímica 26

3.3.1 Técnicas de imunohistoquímica 27
3.3.1.2. Avaliação da reação imunohistoquímica 32

3.4 Estadiamento 32

3.5. Avaliação Estatística 34

4. RESULTADOS 38
4.1 Pacientes 38
4.1.1 Idade 39
4.1.2 Sexo 40
4.1.3 Distribuição Topográfica 41
4.1.4 Estadiamento de Enneking 43
4.1.5 Metástase 44
4.1.6 Avaliação dos Exames de Imagem 45
4.1.7 Óbitos 46
4.1.8 Avaliação Anatomopatológica 47
4.1.8.a Rosetas de Homer Wright 48
4.1.8.b Necrose Tumoral Espontânea 49
4.1.8.c. Mitose 50
4.1.9 Histoquímica 51
4.1.10 Avaliação Imunohistoquímica 52
4.1.10.a NSE 52
4.1.10.b S100 53
4.1.10.c Vimentina 54
4.1.10.d Leucocitário Comum 55
4.1.10.e Cam 5.2 (Citoqueratina) 56
4.1.10.f Leu-7 57
4.1.10.g Neurofilamento 58
4.1.10.h Cromogranina 59
4.1.10.i Synaptofisina
60
4.1.10.j G.F.A.P. 61
4.1.10.k Bcl-2 62
4.1.10.l CD99 (HBA71) 63

4.2. CORRELAÇÃO ANÁTOMOCLINICA 64

5 ILUSTRAÇÕES 89

6. DISCUSSÃO 112

7. CONCLUSÕES 128

8. BIBLIOGRAFIA 130

9. SUMMARY

10. ANEXO 1

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fortunato Badan Palhares, pelo início de tudo....

À minha orientadora, Prof. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden, pela preciosa ajuda, pelas críticas, correções, e todo o incentivo que me ajudaram nesta conquista.

À Dra Silvia Regina Brandalize, por todos esses anos de convivência mostrando à todos nós, médicos e cientistas, o valor da persistência e do espírito de luta.

À Dra. Massako Aoki, que nos momentos de cobranças, indecisões, e de grande stress, sempre soube me mostrar como atravessar os abismos.

À todos os amigos e companheiros que estiveram comigo nessa empreitada, ajudando, criticando, incentivando, fazendo de detalhes itens muito importantes. Doando horas de folga, me substituindo, me alertando...E também:

Dr. Alejandro Enzo Cassone, o amigo de muitas horas.

Dr. Marcelo Alvarenga, pela presteza em emprestar os blocos e laminas de muitos pacientes estudados,

Prof. Dr. José Vassalo, por permitir o uso do laboratório nos fins de semana.

Ao pessoal do laboratório de Imunohistoquímica, especialmente a Dra Sílvia, que muitas vezes adiantou meu trabalho, sem talvez saber o quanto me ajudava na economia desse tempo.

Sr. Marcos – fotógrafo – paciente e dedicado ao seu trabalho.

Às meninas, Beth e Maria do Carmo, secretárias que fizeram diferença por fazerem seu trabalho com dedicação e profissionalismo.

À Renata e Cristiane, minhas secretárias, que quase enloqueceram na adequação de meus horários cirúrgicos e de consultório.

Agradecimento especial

Ao

Prof. Dr. Konradin Metze, obrigado por tudo....

Um pai certamente não faria melhor por seu filho...

Dedico esse trabalho à

Emilia e Eugenio Augusto, meus pais.....

Para

Cida, Bruno e Júlia, por serem tudo o que são....

RESUMO

RESUMO

Os objetivos desse trabalho, foram avaliar o perfil morfológico e imunohistoquímico e sua relação com o prognóstico nos Sarcoma de Ewing/PNET.

Foram estudados 32 pacientes (16 pacientes de cada sexo), todos caucasóides, portadores de tumor de pequenas células redondas, diagnosticados como sarcoma de Ewing e PNET, num período compreendido entre 1989 e 1997.

Clinicamente foram avaliados quanto à idade, sexo, topografia da lesão, presença de metástase ao diagnóstico e estadiamento do tumor.

O estudo histopatológico foi avaliado quanto a: atipia celular, presença de rosetas de Homer-Wright, necrose tumoral espontânea, e índice mitótico. Também foi avaliada a presença de glicogênio intracitoplasmático e o padrão de distribuição das fibras de reticulina.

No estudo imunohistoquímico, foram utilizados um painel com 12 marcadores para avaliação de diferenciação celular: mesenquimal, epitelial, neural, glial, e leucocitária, glicoproteína da membrana celular, além do gem que controla a apoptose celular.

Utilizou-se o método estatístico de Cox Mantel, e sobrevida de Kaplan Meier, para avaliação de fatores prognósticos.

A idade dos pacientes variou de 02 a 36 anos com média de 15,11 anos. A localização topográfica do tumor teve a seguinte distribuição: no esqueleto

apendicular (71,87%), e no esqueleto axial (28,13%) o qual mostrou tendência ao comprometimento do prognóstico.

A maioria dos tumores era composto por células uniformes, redondas e escuras, o padrão atípico foi observado em 18,75%, a formação de rosetas em 21,87%, e necrose tumoral espontânea em 65,62%. A maioria dos casos mostrou um índice mitótico menor que 1 (87,5%). Presença de glicogênio foi encontrada em 53,12% das biópsias, e estava ausente as fibras de reticulina envolvendo as células tumorais.

Os resultados da imuno-histoquímica foram os seguintes: : Vim (75%); Cam-5.2 (9,37%); NSE (34,37%);S-100 (25%); Leu-7 (9,37%); Sin (21,87%); NF (3,12%); CGR (43,75%); GFAP (12,5%); LCA (ausente); CD99 (71,87%); Bcl-2 (6,25%).

Os fatores significantes de pior prognóstico, foram dois marcadores de diferenciação neural: um morfológico, caracterizado pela presença de rosetas de Homer-Wright e outro imuno-hitoquímico, representado pela expressão do NSE. Com esses marcadores foi construído um índice chamado de Índice de Diferenciação Neural (IDN). Esse índice foi graduado com valores de 0 à II, onde o **grau 0** significa a ausência dos marcadores, o **grau I** a presença de pelo menos um desses marcadores, e o **grau II** com a presença dos dois marcadores neurais. Este índice mostrou-se muito sensível com o aumento diretamente proporcional da sua graduação com piora prognóstica(p=0,0028).

Teoricamente, a presença de metástase ao diagnóstico, tem sido um fator clínico que compromete a sobrevida. Embora sem significância estatística (p= 0,2312), todos os nossos pacientes portadores de metástase ao diagnóstico, foram a óbito nos primeiros 20 meses do acompanhamento da doença. Além da metástase ao diagnóstico, outros fatores tais como, necrose tumoral espontânea, e a localização no esqueleto axial, tem sido de relevância prognóstica na literatura. Com esses dados criamos o I.G.S. (Índice global de sobrevida), que associa esses fatores com o I.D.N.

O I.G.S. é graduado de 0 à III, onde o grau 0, é a completa ausência desses fatores, e de I à III, pela somatória gradativa de cada um desses fatores. Notamos significância prognóstica na aplicação desse índice (p=0,005).

CONCLUSÕES:

1 – A diferenciação neural caracterizada pela presença de rosetas de Homer-Wright e positividade ao N.S.E., demonstraram estreita correlação com redução de sobrevida, tornando fundamental a sua pesquisa nas avaliações histopatológicas do sarcoma de Ewing/PNET.

2 – O Índice de Diferenciação Neural (IDN), foi definitivo em mostrar a piora do prognóstico à medida do aumento da sua graduação.

3 – A correlação prognóstica observada na aplicação do Índice Global de Sobrevida (IGS), que agrupa: I.D.N., metástase presente ao diagnóstico, necrose tumoral espontânea e a localização topográfica no esqueleto axial, mostra-se promissora nos estudos dos sarcomas de Ewing/PNET.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. SARCOMA DE EWING

O Sarcoma de Ewing (SE), é uma neoplasia óssea primária altamente agressiva, composta por células redondas imaturas sem produção de matriz óssea, que acomete preferencialmente os ossos longos de crianças e adolescentes (FECHNER & MILLS, 1993; UNNI 1996; DORFMAN & CZERNIAC, 1998). É considerado um tipo de sarcoma relativamente raro, ocupando cerca de 6 a 8% de todas as neoplasias primárias do osso, e ocupa a 4ª posição dentre as neoplasias ósseas malígnas, vindo depois do mieloma, do osteossarcoma e do condrossarcoma. Se retirarmos desta estatística o mieloma, o SE chega a ocupar 16% dos tumores malígnos primários do osso (UNNI, 1996).

Esse tumor foi inicialmente apresentado por Lucke em 1866, (FECHNER & MILLS, 1993), como uma neoplasia malígna de células pequenas e redondas. Mas foi em 1921, que James Ewing descreveu detalhadamente esse tumor, o qual rotulou-o de endotelioma difuso do osso. A partir de 1929 foi reconhecido e denominado, até os dias de hoje, como Sarcoma de Ewing (FLECHNER & MILLS, 1993). Em 1971 se pensava que ele teria origem nas células imaturas do retículo, ou do mesênquima primitivo da cavidade medular do osso (FLECHNER & MILLS,1971). Também não

é recente a suspeita de que o SE apresenta características de diferenciação neural. Willis em 1940 o rotulou como sendo a metástase do neuroblastoma.

1.1.1 ACHADOS CLÍNICOS

Aproximadamente 80% de todos os pacientes tem menos de 20 anos e 50% estão na segunda década de vida (onde ocorre o pico de incidência).O restante dos casos são diagnosticados entre 20 e 30 anos. É muito raro à partir da 3ª década, e quando se confronta com a possibilidade de Sarcoma de Ewing nesta idade, deve-se eliminar o carcinoma de pequenas células e linfomas de alto grau como principal diagnóstico diferencial. E em crianças muito pequenas, a possibilidade de neuroblastoma metastático ou leucemia aguda também deverão ser descartadas (DORFMAN & CZERNIAK, 1998).

O SE tem predileção pelo sexo masculino na proporção de 1,3 e 1,5 homens para 1 mulher, e é praticamente inexistente na raça negra (FLECHNER & MILLS,1993).

A forma mais comum de apresentação clínica, tem sido a dor local e massa palpável. Embora estes sejam os sinais mais freqüentes da doença, não são patognomônicos dela. O tempo de história varia muito, alguns pacientes chegam a apresentar queixa de dor, por exemplo, meses antes do diagnóstico. Geralmente quando o paciente apresenta sintoma de dor, edema local, associados à clínica, além de alterações do hemograma, como anemia e aumento do V.H.S.e febre, deve-se

suspeitar da doença em estágio avançado. Cerca de 70% dos pacientes apresentam-se ao diagnóstico com a doença disseminada com o envolvimento de outros ossos tardiamente (FLECHNER & MILLS, 1993).

A localização do tumor no esqueleto ocorre preferencialmente nos ossos tubulares longos, sendo que o fêmur é o local mais comum deles, seguidos pela tíbia, úmero e fíbula. Nesses ossos acomete preferencialmente a diáfise ou metáfise. Na seqüência, observa-se o envolvimento do esqueleto axial, preferencialmente a pélvis, seguida pela coluna vertebral e costelas. Aproximadamente mais de 2/3 dos sarcoma de Ewing tem apresentação nos membros inferiores e na pélvis. Qualquer outro osso pode ser afetado, incluindo os ossos crânio-faciais (DORFMAN & CZERNIAK, 1998).

1.1.2.ACHADOS DE IMAGEM:

Os achados de imagem não são característicos e variam muito na dependência de fatores como: idade, o local de acometimento, a expansão do tumor e as reações endóstica e periosteal, em resposta a agressão tumoral. Classicamente, o tumor cresce infiltrando-se através dos espaços intermedulares, canais de Harvers e Volkman, e periósteo, onde freqüentemente causa um tipo de reação periosteal, formando múltiplas camadas reacionais infiltradas por tumor e provocando uma alteração radiográfica que se assemelha a "casca de cebola", nos ossos tubulares longos.

(Figs. 1-2). É também descrito um defeito de aspecto côncavo na superfície óssea que é referida como padrão em formato de " pires " e predominantemente encontrada em tumores de localização subperiosteal ou nas lesões intramedulares (DORFMAN &CZERNIAK, 1998). O córtex é permeado e a massa tumoral que vai se alojar no espaço subperiosteal e em partes moles produz uma compressão que se reflete na superfície cortical externa, deprimindo-a, levando a uma imagem semelhante a de um pires. A maioria dos sarcomas de Ewing apresenta lesões predominantemente líticas, infiltrativas e com reação periosteal incaracterística ((DORFMAN & CZERNIAK, 1998; CAMPANACCI & RUGGIERI, 1993; FLECHNER & MILLS,1993).(Figs. 3,4)

Quando a infiltração do osso é difusa e se formam nódulos neoplásicos confluentes, se observam áreas de osteólise com pequenas áreas de erosão da cortical, mostrando um aspecto irregular conhecido como "roído de traças". Todos esses aspectos radiográficos não são patognomônicos do SE, sendo obrigatório o diagnóstico diferencial com o carcinoma metastático, o linfoma maligno, a osteomielite e a histiocitose de células de Langerhans.

Freqüentemente existe uma desproporção entre o aspecto radiográfico e o volume anatômico do tumor. Anatomicamente ele é maior do que mostra a radiografia simples da região acometida. Com o advento e popularização da tomografia computadorizada (CT) e da ressonância nuclear magnética (RNM), a visualização do volume e limites tumorais ficaram mais precisos, o que permite uma melhor avaliação da extensão deles, em exames pré-operatórios e pós quimioterápicos

(CAMPANACCI & RUGGIERI 1993). (Figs. 5,6)

A cintilografia óssea, é um estudo recomendado. O exame é sensível e sem morbidade, permite explorar todo o esqueleto, e se evidencia o tamanho do tumor assim como a possibilidade de acometimento de outros ossos (FAUCHET et al, 1989).(Fig. 7).

1.1.3. ASPECTO MACROSCÓPICO

O componente intra-ósseo do tumor, tem consistência firme, coloração acinzentada tipo cerebróide, com zonas alternadas de cor vinhosa por hemorragia, e outras de tonalidade amarelada e de consistência amolecida, devido à necrose. Freqüentemente, a necrose está associada a um líquido de aspecto leitoso, que pode ser confundido com pus (osteomielite purulenta) e a cultura se faz obrigatória. (CAMPANACCI & RUGGIERI, 1993; UNNI, 1995).

A cavidade medular parece ser o local da origem do tumor, mas no entanto ele pode invadir todas as porções do osso e freqüentemente partes moles, que na maioria das vezes, é também friável e macia. Não raro o componente extra-ósseo pode ser maior que o componente intramedular (FLECHNER & MILLS,1993).

1.1.4. ASPÉCTOS MICROSCÓPICOS

O SE clássico, mostra-se como uma neoplasia de células mesenquimatosas indiferenciadas que crescem em arranjo sólido, formando lençóis densamente compactados ou ninhos septados por traves conjuntivas delicadas e vascularizadas. (Fig. 8). As células são pequenas, poligonais; citoplasma escasso, com bordos celulares indistintos. O núcleo é central, redondo ou oval com cromatina finamente granular e dispersa, e contem de um a três nucléolos pouco evidentes.O número de figuras de mitose é variável e em muitos casos a escassez de mitoses contrasta com aparência imatura das células.

O tumor também pode exibir um padrão bifásico que é simulado pela presença das chamadas células claras (ou células principais) dada pela cromatina delicada e as células escuras (ou células secundárias) devido a condensação nuclear representada nas células em apoptose.(Fig. 9). A relação entre esses dois tipos de células, varia de tumor para tumor, e em diferentes áreas do mesmo tumor, muitas vezes, criando um padrão pseudo-organóide (DORFMAN & CZERNIAK, 1998).

Alguns casos referidos como Sarcoma de Ewing atípico, as células tumorais são maiores (20 a 24 μm), comparadas com a forma clássica, na qual o tamanho médio das células é de 14μm.(Fig. 10). Também podem mostrar vacuolização citoplasmática e exibir grande heterogeneidade, porém não tem a aparência observada dos sarcomas pleomórficos ou neoplasias epiteliais (LLOMBARD – BOSCH et al,

1996). O número de mitoses pode ser variável (FLECHNER & MILLS, 1993; SCHAJOWICZ, 1995). Não há formação de osso ou cartilagem tumoral, o que permite diferenciar o SE do osteossarcoma de células redondas e do condrossarcoma mesenquimatoso, respectivamente.

Necrose é um achado freqüente no sarcoma de Ewing e pode variar desde pequenos focos até áreas extensas e irregulares.(Fig. 12). Estas áreas de necrose podem estar associadas à infiltração de neutrófilos que podem ser confundidas com osteomielite aguda. Alterações císticas degenerativas, comumente preenchidas por sangue, podem ocorrer e simular um cisto ósseo aneurismático (DORFMAN & CZERNIAK, 1998).

O glicogênio intracitoplasmático, pode ser demonstrado através da reação pelo ácido periódico de Shift (PAS), mas a quantidade pode também variar de tumor para tumor, e em diferentes porções da mesma neoplasia.(Fig. 14). Segundo Schajovicz (1994), esse aspecto tem valor diagnóstico, pois não é encontrado nos linfomas malignos, e nas metástases ósseas do neuroblastoma, tumores esses, que fazem parte do diagnóstico diferencial histológico com o Sarcoma de Ewing .

A coloração pela reticulina evidencia a distribuição lobular, sem o envolvimento individual das células. Também é critério importante na distinção com o linfoma ósseo, uma vez que neste, em geral, se observa trama reticular proeminente envolvendo célula por célula (SCHAJOWICZ, 1994).(Fig.15)

1.1.5. ASPECTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

O aspecto imuno-histoquímico tem sido objeto de muitos estudos para o diagnóstico e o prognóstico do SE (AMBROS et al, 1991; CAVAZZANA et al, 1987; DAUGGARD et al, 1989; FELLINGER et al, 1991, 1992; HARA et al, 1989; HESS et al, 1997; HARTMAN et al, 1991; KUDO et al, 1989; LLOMBARD – BOSCH et al, 1988, 1996; LADMIL et al, 1990; NAVARRO et al, 1994; RAMANI et al, 1993; SHANFILD et al, 1997; STEVENSON et al, 1994; TSOKOS et al, 1984; USHIGOME et al, 1989). A positividade para a Vimentina (VIM) está presente na maioria dos SE. Em relação aos marcadores de diferenciação neural , o Neurofilamento (NF), é praticamente pouco reativo (COFFIN et al, 1997), o Leu-7 e enolase neural específica (NSE), estão ausentes. Porém a Sinaptofisina,(SYN) está presente em um grande número desses tumores (FLECHNER & MILLS, 1993).

O SE típico não exibe positividade para o antígeno leucocitário comum (LCA), que é comumente usado para diagnóstico diferencial com os linfomas. Os SE apresentam positividade exagerada para o MIC-2 gem, situado no braço curto do cromossoma sexual, produzindo grande quantidade de uma proteína de superfície expressa pelo antígeno CD99 e detectada pelos anticorpos monoclonais MIC-2, HBA-71, e o 013 (FLECHNER & MILLS, 1993; STIVENSON et al, 1994).

1.1.7. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Os diagnósticos diferenciais morfológicos se fazem principalmente com:

Sarcoma Osteogênico de Pequenas Células e Condrossarcoma Mesenquimatoso. A distinção de se faz , pela demonstração nesses tumores, da produção da matriz osteóide e cartilaginosa respectivamente, associada a presença de células pequenas escuras. Os aspectos radiográficos, e clínicos são também importantes para se estabelecer a diferença. Os marcadores imuno-histoquímicos, podem ser de grande ajuda para essa diferenciação. (FLECHNER & MILLS, 1993).

Linfoma Ósseo. É encontrado com freqüência em pacientes de mais idade (acima dos 40 anos). À microscopia ótica, embora ambos os tumores sejam compostos por células redondas, nos linfomas os núcleos são proeminentes e riniformes, diferente do contorno nuclear regular do SE. Para complicar, alguns linfomas pediátricos, linfomas linfocíticos de alto grau, e leucemias linfóides agudas podem expressar positividade para o CD99 (MIC-2) (RIPOEL et al, 1994). A positividade do antígeno Leucocitário Comum (LCA), associado aos linfomas, contribui para o diagnóstico. Também a coloração para as fibras de reticulina pode ajudar, quando presente favorece o linfoma.

Neuroblastoma metastático. Quando presente no osso, o paciente tem na maioria das vezes, menos de 5 anos de idade, e o quadro clínico de tumor primário retroperitoneal, juntamente com a presença de catecolamina urinária, pode ser de grande contribuição para o diagnóstico.

A avaliação da microscopia óptica mostra células redondas com núcleos proeminentes e formação de rosetas verdadeiras de Homer - Wright. Através do estudo imuno-histoquímico as células apresentam forte positividade para marcadores neurais como o Leu-7, NSE, SYN, NF, e Vimentina, o SE ocasionalmente pode apresentar em menor intensidade a positividade para o NSE e Leu-7, mas costuma ser negativo para o NF, SYN (FLECHNER & MILLS, 1993).

Rabdomiossarcoma metastático. Esse tumor freqüentemente afeta pacientes jovens, podendo dar metástase para o tecido ósseo. Ocasiona problema com o diagnóstico diferencial morfológico com o SE, principalmente com as variantes: embrionária e alveolar. Ajuda muito quando existe diferenciação rabdomioblástica e positividade para marcadores musculares como: desmina; HHF35 e actina sarcomérica.

Tumor Neuroectodérmico Primitivo(PNET). Esse tumor e o SE estão em íntima associação, e por definição, o PNET seria o SE com comprovada diferenciação neural (DORFMAN & CZERNIAK, 1998). Clínicamente, há uma maior freqüência de metástase ao diagnóstico no PNET e esse tumor costuma responder menos ao tratamento quimioterápico (FLECHNER & MILLS, 1993).

Carcinoma de pequenas células metastático. Este ocorre em pacientes de maior idade e quando conhecido o tumor primário, o diagnóstico é definitivo. Na ausência, essa situação pode ser complicada, ainda mais que, a presença de queratina de baixo peso molecular tem sido detectada em torno de10% dos SE (COLLINE et

al, 1998). Ajuda excluir o SE a positividade para vários sub tipos de queratina e outros marcadores epiteliais como EMA e CEA e negatividade para o CD99 (MIC-2).

1.1.8. TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

O tratamento do SE, se faz pela quimioterapia, radioterapia e a ressecção do tumor . A radioterapia, antes da década de 80 era praticamente a única forma de tratamento que se dispunha além da quimioterapia, cuja aplicação estava se iniciando. Com a evolução das drogas quimioterápicas (e o uso de várias associações delas), o melhor conhecimento das conseqüências da radioterapia, a evolução da cirurgia na ressecção em bloco dos tumores, a possibilidade de reconstrução ortopédica preservando o membro acometido, melhorou significativamente o tratamento desses tumores.

As lesões nos ossos dispensáveis, como a fíbula, costelas, são ressecadas cirurgicamente após quimioterapia prévia, com sobrevida acima dos 65% em 5 anos (FLECHNER & MILLS, 1993). Os tumores localizados na pelve, apresentam prognóstico pior, provavelmente pelo acesso cirúrgico difícil e com margem exígua na ressecção (FRASSICA et al, 1993).

A presença de metástase ao diagnóstico ou durante a evolução do tratamento, implica em piora das condições e menor tempo de sobrevida (doença disseminada) (FLECHNER & MILLS, 1993; USHIGOME et al, 1989; PICCI et al, 1993).

Existe uma variedade de fatores anatomopatológicos e clínicos que podem influenciar na sobrevida dos pacientes com SE. Pacientes com idade abaixo de 10 anos respondem melhor ao tratamento que os mais velhos, e em pacientes com doença localizada em ossos que não pélvicos, tem melhor prognóstico (FLECHNER & MILLS, 1993).

O volume estimado através dos exames de imagens, pode também ser correlacionado. Pacientes com lesões menores que 100 ml tem cerca de 80% de sobrevida em 3 anos, comparados com apenas 32% dos pacientes com tumores de maior volume (JÜRGENS et al 1988). Essa relação também foi confirmada por outros estudos, porém com o ponto de corte de 200 ml, em relação ao volume da lesão (AHRENS et al, 1994).

Alguns achados histológicos estão implicados como de valor prognóstico. Há trabalhos que observaram necrose espontânea extensa em lesões não tratadas, demonstraram um comportamento clínico pior e baixos índices de sobrevivência à doença (DAUGAARD et al, 1989; de STEFANI et al, 1984; LLOMBARD - BOSCH et al, 1986). Outros estudos tem mostrado a presença de células escuras (apoptóticas) , que por vezes assumem o padrão pseudo – organóide (também conhecido como tabuleiro de xadrez ou "filagree"). Esse arranjo arquitetural é um fator preditivo, para pior prognóstico (TERRIER et al, 1996 ; KISSANE, 1983).

A correlação entre alto índice mitótico (1 ou mais por campo de maior aumento) e baixa sobrevida já foi detectado por Daugaard et al em 1989.

1.2. TUMOR NEUROECTODÉRMICO PRIMITIVO (PNET)

Uma das mais antigas descrições em literatura do PNET, foi feita por Stout, em meados de 1918, na qual ele se referiu a um tumor do nervo ulnar que lembrava o neuroepitélio primitivo. Penfeld em 1932, introduziu pela primeira vez o termo " neuroepitelioma periférico ", a um tumor de partes moles lobulado e de células redondas, que formava rosetas no exame histopatológico.

Os Sarcoma de Ewing e o PNET, foram consideradas entidades clínico patológicas separadas no passado, agora são aceitos como espectros de uma mesma doença (COFFINS et al, 1997).

A hipótese, de que o PNET e SE, fazem parte de uma mesma família de neoplasia, vem sendo cada vez mais aceita, porque dividem semelhanças de anormalidades citogenéticas, como por exemplo a translocação dos pares de cromossomas t(11-22) e q(24-12). Estudos de oncogênese, revelam a existência em ambos de uma glicoproteína de peso molecular de aproximadamente 30KDa, ligada ao cromossomo X que é denominada de MIC-2 (P 30/32) e que é evidenciada pelos anticorpos MIC-2, HB71 e 013. Aproximadamente 90% dos SE e PNET expressam esse marcador (COFFINS et al, 1997; DORFMAN & CZERNIAK, 1998).

É um tumor maligno primitivo do osso, que lembra o SE, clinicamente, radiograficamente, a luz da microscopia óptica e a nível de biologia molecular. A distinção com o SE se faz baseada principalmente, na comprovação de diferenciação neural do primeiro.

Por muitos anos foi conhecido o PNET de partes moles, e foi distinguido do SE por Jaffe em 1984. Antes desta época, todos os tumores com essas características neurais eram diagnosticados como SE. Jürgens et al (1994), sugerem que os critérios de diferenciação sejam, aqueles que incluam a positividade imunohistoquímica para diferenciação neural, como NSE e a evidência de rosetas de Homer - Wright, ou a demonstração ultraestrutural que caracterize a diferenciação neural como grânulos neurosecretores, neurotúbulos e neurofilamentos. Já Schimidt (1991), caracterizou o PNET como um tumor de células redondas que apresente positividade para pelo menos 2 marcadores neurais e ou rosetas verdadeiras de Homer-Wright.

O estudo imuno-histoquímico com marcadores para o NSE, NF, SYN, pode ser suficiente para separar os dois tumores, podendo estar aliados a comprovação histopatológica de diferenciação neuroectodérmica. Os estudos citogenéticos de oncogenese demonstram estreita relação entre os dois, principalmente a positividade exacerbada pelo gem pseudoautossômico MIC-2 (STEVENSON et al, 1994).

1.2.1 ASPECTOS CLÍNICOS

No passado os PNETs, incluíam tumores originados em partes moles, principalmente da parede torácica, chamados de tumor de Askin (tumor maligno de células redondas de origem tóraco-pulmonar), mas hoje se incluem nessa categoria também os tumores originados primariamente nos ossos. É uma neoplasia malígna que acomete crianças, adolescentes e adultos jovens, e é bem mais raro que o SE. Há

uma predominância para o sexo masculino. Apresenta sinais clínicos, como febre, e queda do estado geral. Na maioria das vezes, já ao diagnóstico do tumor primário, estão presentes metástases à distância (DEHNER LP, 1993).

Anatomicamente, os sítios de maior incidência são os ossos do esqueleto axial (costelas, esterno e vértebras) , existindo a seguir uma predileção pela fíbula e um menor envolvimento com o fêmur e úmero (FLECHNER & MILLS, 1993).

1.2.2 ACHADOS DE IMAGEM

Não apresenta diferença em relação ao SE, com grande comprometimento de partes moles além da lesão óssea.

1.2.3 ASPECTOS MACROSCÓPICOS

Macroscopicamente é impossível distinguir o PNET do SE. Ele se apresenta na maioria das vezes com aspecto multinodular ou lobulado, com alternância entre massa sólida branca ou áreas mucóides, moles, císticas e parcialmente hemorrágicas, com focos de necrose (COFFINS et al, 1997; FLECHNER & MILLS, 1993). Apesar da origem, não se evidencia correlação direta com raiz nervosa. (FLECHNER & MILLS,1993).

1.2.3. ASPÉCTOS MICROSCÓPICOS

Microscopicamente o tumor tem todas as alterações do Sarcoma de Ewing. É composto por células mesenquimatosas, pequenas, redondas de citoplasma escasso, formando lençóis celulares separadas em lóbulos por traves fibrovasculares. Nos casos típicos a presença inequívoca de rosetas do tipo Homer - Wright, é um fator importante para o diagnóstico. Llombard - Bosch & Olaya em 1983, propuseram que 20% ou mais do tecido tumoral deveriam exibir rosetas do tipo Homer - Wright para ser considerado do ponto de vista morfológico como PNET. Porém, na experiência de Dorfman & Czerniak 1998, se esse critério for levado em consideração o diagnóstico de PNET é extremamente raro.

A roseta do tipo Homer - Wright, é caracterizada, por células tumorais dispostas em arranjo nitidamente circular, contendo prolongamentos celulares, caracterizados por processos que formam um material fibrilar com orientação para dentro, ou seja para a porção central da estrutura. Esse tipo de roseta é idêntica à encontrada no neuroblastoma. Outros arranjos semelhantes à rosetas, caracterizados por 6 a 10 células orientadas de forma circular com o centro vazio também podem estar presentes, mas não podem, de forma isolada, serem utilizadas como evidência de diferenciação neural (DORFMAN & CZERNIAC 1998).

Como a grande maioria dos PNETs exibe semelhança histopatológica com o SE, só poderá ser distinguido, na existência de diferenciação neural caracterizado pela presença de rosetas verdadeiras, bem como através de estudos ultraestruturais ou

imuno-histoquímicos. O glicogênio intracitoplasmático está presente em menor quantidade no PNET cerca de 30% dos casos (COFFIN et al, 1997).

1.2.4. ASPECTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Um dos mais importantes achados para o diagnóstico e a separação do PNET e SE, dos outros tumores de células redondas, é o reconhecimento nos primeiros do gem MIC-2. A coloração pelos anticorpos de proteína glial fibrilar (GFAP), citoqueratina, desmina e leucocitário comum, tem se mostrado negativa, na grande maioria dos estudos de diferenciação (FLECHNER & MILLS,1993), servindo para diferenciar os SE/PNET dos outros tumores de células redondas.

O PNET apresenta praticamente 90% de forte positividade para o NSE e outros marcadores usados para reconhecimento do PNET, incluem o Leu-7, syn, S100, em 40% de positividade dos casos, e cromogranina (CGR) em 20% (COFFIN et al - 1997).

1.2.5. ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS

Encontram-se alterações celulares do tipo microtúbulos, núcleo com grânulos densos, e lâmina basal envolvendo o citoplasma das células tumorais. As rosetas exibem área central preenchida por prolongamentos citoplasmáticos (FLECHNER & MILLS,1993).

1.2.6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Neuroblastoma metastático. Ocorre em crianças com menos de 5 anos de idade, mostra tendência a metastatizar para o osso do crânio, e está associado a altos níveis de catecolaminas excretadas na urina. A investigação desses metabólitos na urina, estão praticamente normais em tumores neuroectodérmicos primários.

Sarcoma de Ewing. Existem muitos estudos na literatura tentando encontrar subsídios que se possam distiguí-lo do PNET (DORFMAN & CZERNIAK, 1998). Acredita-se que o SE é uma forma indiferenciada do PNET (FLECHER & MILLS, 1993). À microscopia óptica, os dois tumores são praticamente idênticos. No estudo imuno-histoquimico, o SE pode apresentar positividade para alguns marcadores neurais do tipo NSE, SYN, Leu-7, o que torna em alguns casos a distinção entre eles muito difícil.

1.2.7. TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

O PNET e o SE, são tratados da mesma forma, o controle local da doença é feito na maioria das vezes com cirurgia, e em locais inacessíveis, com radioterapia. Estudos na literatura tem mostrado sempre um prognóstico pior em pacientes portadores do PNET, principalmente quando metástases estão presentes ao diagnóstico (FLECHNER & MILLS, 1993; SCHAJOWICZ, 1993).

1. 3. JUSTIFICATIVA

Como se pode observar, o SE e o PNET são muitos semelhantes entre si do ponto de vista clínico, radiográfico, à microscopia óptica e ao nível de biologia molecular, sendo que a distinção entre os dois está na demonstração clara de diferenciação neural no PNET.

Estudos citogenéticos também tem documentado estreita relação entre eles. Ushigome et al (1992), propõem serem esses dois tumores de mesma origem, na qual representariam apenas estágios diferentes da mesma doença, e numa analogia espectral, num extremo estaria o SE, representados por células totalmente indiferenciadas e no extremo oposto ficaria o PNET demonstrado pela diferenciação neural celular.

O diagnóstico do SE/PNET é feito praticamente por exclusão dentre outros sarcomas de células redondas. O advento da imuno-histoquímica e o seu constante aprimoramento tem sido fundamentais no diagnóstico, na classificação, e no prognóstico dos SE/PNET. Porém esses estudos mostram freqüência por vezes distintas entre os autores, à exemplo da tabela abaixo.

	ROSEMBERG et al 1994	COFFIN et al 1997
VIM	93,6	
CAM	17%	< 10%
NSE	68,5%	
S100	24,4%	40%
Leu7	28,2%	40%
NF	7,1%	40%
CGR	1,3%	20%
SYN	2,6%	40%
GFAP	0%	10%
LCA	0%	0%
MIC2	87,1%	90-100%
Bcl2	53,9%	

Baseados em distintos resultados quanto à distribuição e freqüência dos marcadores celulares, através da imuno-histoquímica, nos Sarcomas de Ewing/PNET, aliados à caracterização de fatores prognósticos, muitas vezes contraditória na literatura, bem como a ausência de estudos nacionais reveladores da expressão anatomo-clínica e imuno-fenotípica desses sarcomas em nosso meio, esse trabalho teve como propósito o seguinte objetivo:

OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho, foi avaliar o perfil morfológico e imuno-histoquímico e sua relação com o prognóstico nos Sarcomas de Ewing / PNET.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foram estudados retrospectivamente 32 casos de biópsias de Sarcoma de Ewing ou PNET, diagnosticados no Depto. de Anatomia Patológica FCM UNICAMP, de pacientes acompanhados no Depto de Ortopedia FCM UNICAMP, e do Centro Infantil Dr Domingos A.Boldrini, no período de 1989 a 1998. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente quanto a: idade, sexo, localização do tumor, exames de imagens (rx simples, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética), estadiamento clínico, e evolução da doença.

3.2 Avaliação histopatológica

O material obtido, através das biópsias, foi fixado em formalina a 10%. Utilizou-se de cortes de 4 μm que foram corados pela hematoxilina e eosina, reação pelo PAS, e impregnação pela prata para as fibras de reticulina (método de Gomori), segundo a padronização técnica (AFIP, 1995).

Através de cortes histológicos corados com H&E, foram avaliados os seguintes itens:

A - Atipia celular: Foi considerado valor (0) quando as células tumorais apresentaram padrão convencional de células uniformes, de pequeno tamanho (14μm médio), citoplasma escasso, núcleos ovais ou redondos com cromatina finamente granular e nucléolos pouco aparentes.

Foi considerado valor (1) quando as células tumorais eram nitidamente maiores (20 - 24 μm) citoplasma amplo e vacuolizado, núcleos largos e com pleomorfismo evidente, comparados ao padrão clássico. (Figs. 10A e 10B).

B - Presença de rosetas: Foi valorizada a roseta do tipo Homer - Wright, que é caracterizada por células tumorais dispostas em arranjo nitidamente circular, contendo prolongamentos ou processos celulares citoplasmáticos, que formam um material fibrilar orientado para o centro da estrutura (DORFMAN & CZERNIAC, 1998), foi atribuído o valor (0) quando ausente e (1) quando presente. (Fig.11).

C. -**Necrose tumoral**: Foi avaliado o grau de necrose tumoral espontânea, uma vez que a análise foi feita no material de biópsia e os pacientes eram virgens de tratamento específico. Considerando-se valor (0) na ausência de necrose ou na presença de necrose celular esporádica e isolada (uma ou outra célula), e valor (1) no caso de necrose de grupo de células, podendo ser

focal: 1A (menor ou igual a um campo de maior aumento) ou confluente, extensa: 1B (maior que um campo de maior aumento). (Fig. 12).

D - <u>Índice mitótico</u>: É o coeficiente entre a somatória do número de mitoses encontradas em 10 campos de maior aumento (Objetiva 40x), aleatório. Foi atribuído valor (0) quando o índice mitótico era menor que um e (1) quando o índice mitótico era igual ou maior que um. (Fig.13).

3.2.2 Avaliação histoquímica

A Glicogênio

Através da reação pelo PAS, foi pesquisado a presença de gliogênio intracelular. (Fig.14)

B Fibras de reticulina

Foi avaliado o padrão de distribuição das fibras de reticulina nos tumores através da impregnação pela prata. (Fig.15).

3.3 Avaliação imuno-histoquímica

No estudo imuno-histoquímico, foram utilizados marcadores celulares para

análise de diferenciação: mesenquimal, epitelial, neural, glial e leucocitária conforme a seguinte relação: Vim (vimentina); Cam-5.2 (queratina); NSE (enolase neural específica); S-100 (proteína S-100); Leu-7 (bainha nervosa); Syn (sinaptofisina); NF (neurofilamento); CGR (cromogranina); GFAP (filamento de proteína glial); LCA (antígeno leucocitário comum); CD99 (glicoproteína da membrana celular MIC-2); Bcl-2 (gem que controla morte celular). Ver tabela A.

ANTICORPO	ORIGEM	CLONE	CÓDIGO	DILUIÇÃO
PRIMÁRIO				
NSE	DAKO	H.14	M873	1:100
S-100	DAKO	POLICLONAL	7311	1:1000
VIMENTINA	DAKO	V9	M725	1:20
LCA	DAKO	CD45	M701	1:50
CAM 5.2	DAKO	35BH11	A575	1:2
LEU-7	DAKO	HNK1	M1014	1:200
N.F.	DAKO	2F11	M762	1:200
C.G.R.	DAKO	POLICLONAL	A430	1:50
SYN.	DAKO	POLICLONAL	A010	1:50
GFAP	DAKO	6F2	M761	1:100
BCL-2	DAKO	124	M887	1:40
CD99	DAKO	12E7	M3601	1:50

Tabela A - descrição dos anticorpos e sua diluição

3.3.1 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram usados 12 anticorpos monoclonais primários, (tabela 1), anticorpo secundário capaz de ligar-se ao primário e conjugado a biotina, e o complexo de peroxidase conjugado a streptavidina e a biotina. A estreptavidina contém 4 sítios para a ligação da biotina, sendo que um deles é ocupado pela biotina ligada ao anticorpo secundário e os outros 3 sítios são acoplados ao complexo biotina peroxidase da solução.

- **Cortes histológicos:** de 4 μm de espessura, foram colocados em lâminas previamente lavadas e desengorduradas, tratadas com solução de organosilano à 2% em acetona (3-Aminopropil-trietoxi-silano - SIGMA cod A 3648). As lâminas com os cortes foram deixadas à temperatura de 34 graus na estufa por 24 horas e então se procedeu a reação imunohistoquímica.

- **Desparafenização:** Realizado banho de xilol à 60° C (15 minutos), seguidos por dois banhos em xilol à temperatura ambiente(10 minutos cada banho) com a finalidade de retirar o excesso de parafina.

- **Hidratação:** Realizada em gradiente decrescente de álcoois (3 banhos de álcool absoluto, I II III, de 2 minutos cada, 1 vez em álcool a 80% por 2 minutos, 1 vez

em álcool à 50% por dois minutos, todos eles à temperatura ambiente. Segue-se lavagem em água corrente por 2 minutos e passagem em água destilada.

- **Inibição da peroxidase endógena:** Banho em solução à 3% de peróxido de hidrogênio em metanol por 15 minutos, à temperatura ambiente, lavagem em água corrente e passagem por água destilada. Incubação em solução tamponada PBS (phosphate buffer saline, pH: 7,6).

3.3.1.1 DESMASCARAMENTO DOS ANTÍGENOS:

- **Método Micro-ondas -** Imersão das lâminas em cuba plástica apropriada para micro-ondas, com tampão citrato 1M, pH 6.0, por 3 períodos de 7 minutos cada, na potência máxima. Após deixar esfriar dentro do forno de micro-ondas durante 10 minutos.

- **Método Autoclave -** Para o anticorpo monoclonal Bcl-2 se faz necessário o desmascaramento do antígeno por autoclave, para melhor identificação. Imersão das lâminas dispostas em berço de metal em autoclave, contendo tampão citrato 1M, pH 6.0, levado a pressão de 120mmhg por 5 minutos. A partir daí desliga-se o autoclave e espera esfriar.

- **Reação antígeno-anticorpo primário:** A reação de incubação, se processa durante o dia à temperatura ambiente por 2 horas. A seguir, retira-se o excesso de anticorpo primário, com 3 lavagens em PBS de 5 minutos cada, à temperatura ambiente.
- **Reação com anticorpo secundário biotinado:** dirigido contra o anticorpo primário, (cadeia pesada). Incubação com anticorpo secundário (anti-imunoglobulinas de camundongos, coelho e cabra, produzidos em porco, Kit Multilink Dako cod. E 453), diluição 1:200 em tampão PBS, com azida sódica, durante 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente. Retira-se o excesso do anticorpo secundário; segue-se 3 lavagens em PBS, 5 minutos cada, à temperatura ambiente.

- **Reação S-ABC - (complexo streptavidina-biotina peroxidase):** Incubação com complexo S-ABC (Kit Dako, cod.K377), diluição 1:50 em tampão Tris 0,05 M. Incubar por 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente, segue-se lavagem em tampão PBS.

- **Coloração:** Realizada em DAB (3,3" tetra-hidrocloreto de diaminobenzidina, Sigma D5637), cromógeno de cor marrom que impregna o sítio celular onde ocorre a reação:

• H2O2 + peroxidase ----------> H2O + 1/2 O2

- **Preparo :** 40mg de DAB em 100ml de tampão PBS e 40ml de peróxido hidrogênio 30%. Deixam-se as lâminas na solução cerca de 3 a 5 minutos, à temperatura ambiente, ou até a visualização de coloração levemente acastanhada dos cortes. Lavagem em água corrente e passagem em água destilada.

- **Contra-coloração :** Realizada com hematoxilina de Mayer, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. Em seguida, lavagem em água corrente (devem ser colocadas algumas gotas de amoníaco na água para melhor evidenciar a contra-coloração e obter melhor contraste. Segue-se lavagem em água corrente e passagem em água destilada.

- **Desidratação:** 3 passagens em álcool absoluto, passagens em 3 xilóis, em seguida, montagem das lâminas com Entellan (Merck, n° 7961)

3.3.1.2. Avaliação da reação imunohistoquímica

Foi feita em microscópio ótico comum, e a reação foi considerado positiva quando as células eram coradas em marrom independentemente da sua extensão. Os casos duvidosos de tonalidade tênue ou presente apenas em célula isolada ou positividade na periferia do corte, foram considerados negativos. Todas as reações foram acompanhadas de controle positivo.

3.4.Estadiamento

Foi utilizado o sistema de estadiamento de Enneking (ENNEKING et al, 1983). Este sistema é baseado em critérios anátomo-clínicos e de imagens (rx simples, tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética e cintilografia óssea) (tabelas B e C).

3.5. Tratamento

Os pacientes foram tratados com protocolo de quimioterapia, radioterapia, e cirúrgicos semelhantes.

ESTADIO	GRAU HISTOLÓGICO	LOCAL	METÁSTASE
IA		INTRACOMPARTIMENTAL	NÃO
	BAIXO		
IB		EXTRACOMPARTIMENTAL	NÃO
IIA		INTRACOMPARTIMENTAL	NÃO
	ALTO		
IIB		EXTRACOMPARTIMENTAL	NÃO
IIIA		INTRACOMPARTIMENTAL	SIM
	INDIFERENTE		
IIIB		EXTRACOMPARTIMENTAL	SIM

Tabela B. Estadiamento de Enneking para Tumores Musculoesqueléticos
Grau histológico Baixo-(Bem diferenciado) Alto (Pouco diferenciado, ou indiferenciado)

INTRACOMPARTIMENTAL	EXTRACOMPARTIMENTAL
Intra-ósseo	Extensão extra-óssea
Intra-articular	Extra-articular
Subcutâneo	Fascia profunda
	Tecidos moles

Tabela C - Classificação de Enneking, para compartimentos anatômicos.

Os resultados obtidos nas avaliações clínicas, estadiamento, aliados aos achados morfológicos e imuno-histoquimicos, foram comparados entre si e correlacionados com a sobrevida dos pacientes.

3.5. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Foram feitos estudos da avaliação da utilidade de variáveis histopatológicas e imuno-histoquímicas como fatores prognósticos, e esses eventos tiveram:

Início: dia da biópsia

Evento esperado: "end point" : óbito

O método utilizado para análises univariadas com variáveis discretas, foi o de : Kaplan Meier. Por causa do número relativamente pequeno dos pacientes, utilizou-se sómente duas categorias, positivo e negativo ("cut-offs naturais).

Os critérios para a dicotomização foram os seguintes :

a - presença ou ausência indubitável dos antígenos

b - presença ou ausência indubitável de necrose

c - presença ou ausência indubitável de rosetas

A diferença entre as curvas foi calculada com um teste estatístico chamado de *Mantel-Haenszel log-rank test* , a variável contínua foi avaliada com o teste Cox univariado. O nível de significância foi de 0,05.

Para a análise da combinação de fatores, usamos o modelo de regressão multivariada de riscos proporcionais de Cox. O método de regressão introduzido por Cox em 1972, é amplamente utilizado quando se necessita avaliar variáveis múltiplas

ao mesmo tempo. Este teste estatístico, é um método semi- paramétrico, que avalia os efeitos de variáveis diferentes no mesmo espaço de tempo.

A probabilidade de sobreviver até qualquer ponto no tempo é estimada a partir da possibilidade acumulativa de sobreviver a cada um dos intervalos de tempo precedentes.

Definição : uma análise de riscos ("azares") proporcionais

risco (azar) (p.ex. probabilidade de falecer) $h(t)$

risco (azar) no começo da observação $h_o(t)$

Modelo univariado :

$$h(t) = [\, h_o(t)]\, e^{BX}$$

Modelo multivariado :

$$h(t) = [\, h_o(t)]\, e^{(B_1X_1 + B2\,X_2 + B_3X_3 + \quad)}$$

$\underline{h(t)}$

$$\ln \text{ ho (t)} = B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + \ldots ;$$

X_1, X_2 ... representam as co-variadas (= parâmetros discretos ou contínuos)

A seleção passo por passo ("stepwise") escolhe os parâmetros relevantes para o modelo.

Modelos baseados em relativamente poucos casos por variável a ser analisada podem mostrar "instabilidade"do sistema, isto é, amostras aleatórias do mesmo conjunto de dados criam modelos com variáveis diferentes.

Recomenda -se incluir pelo menos 10 eventos de desfecho para cada variável preditória no modelo. Para avaliar a "estabilidade" do modelo criado, pode ser usado o método de bootstrap (CHEN et al 1985). Neste procedimento criam-se múltiplos conjuntos de dados a partir de um sorteio de casos, com reposição após cada sorteio do conjunto original de dados.

Cada grupo "novo" será testado com a regressão Cox, a fim de comprovar as variáveis calculadas neste modelo com o modelo Cox obtido no grupo original de dados.

Foram consideradas importantes as variáveis que apareceram associadas com algum fator de mau prognóstico na evolução.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Pacientes

Dos 72 pacientes eleitos para o estudo somente 33 casos estavam completos, com material anatomopatológico e história clínica com dados suficientes para a avaliação proposta no objetivo do trabalho. Destes, 1 caso devido a positividade para o LCA (Antígeno leucocitário comum) e negatividade para o CD99, foi excluído da avaliação devido a se tratar de um linfoma ósseo. Todos os pacientes tem etnia caucasóide.

4.1.1 IDADE

A idade variou de 02 à 36 anos com uma média de 15,11 anos. A tabela e gráfico abaixo, mostram a distribuição dos pacientes segundo a faixa etária.

FAIXA ETÁRIA	N	%
0 – 10	13	40,62%
11- 20	13	40,62%
20 – 40	08	18,76
TOTAL	32	100%

Tabela 1. Distribuição dos pacientes quanto à faixa etária.

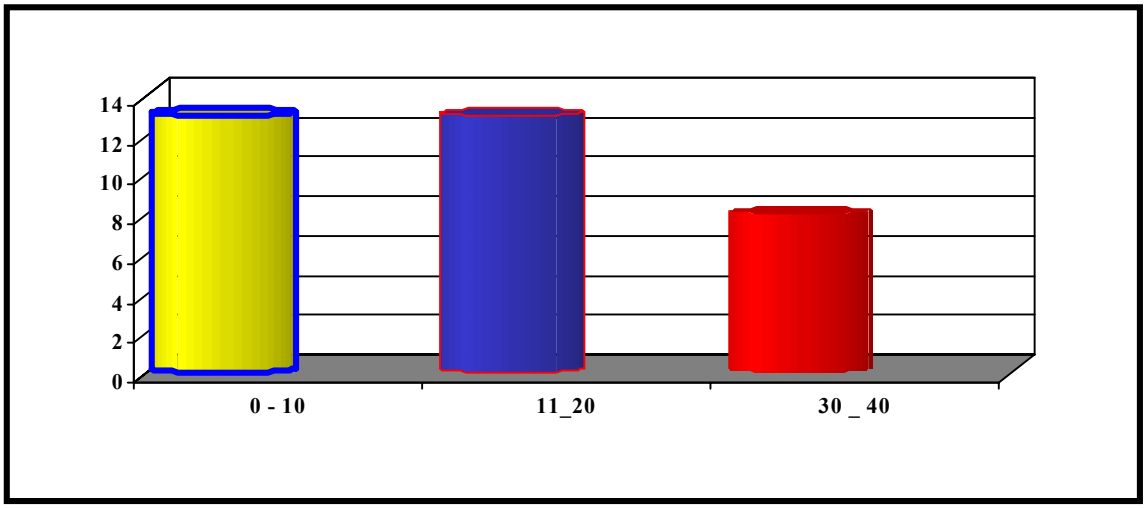


Gráfico 1. Distribuição dos pacientes quanto à faixa etária

4.1.2 SEXO

A distribuição dos pacientes relativo ao sexo, caracterizou-se por: 16 pacientes do sexo masculino e 16 pacientes do sexo feminino, segundo tabela 2.

SEXO	N	%
MASCULINO	16	50%
FEMININO	16	50%
TOTAL	32	100%

Tabela 2 Distribuição dos pacientes segundo o sexo.

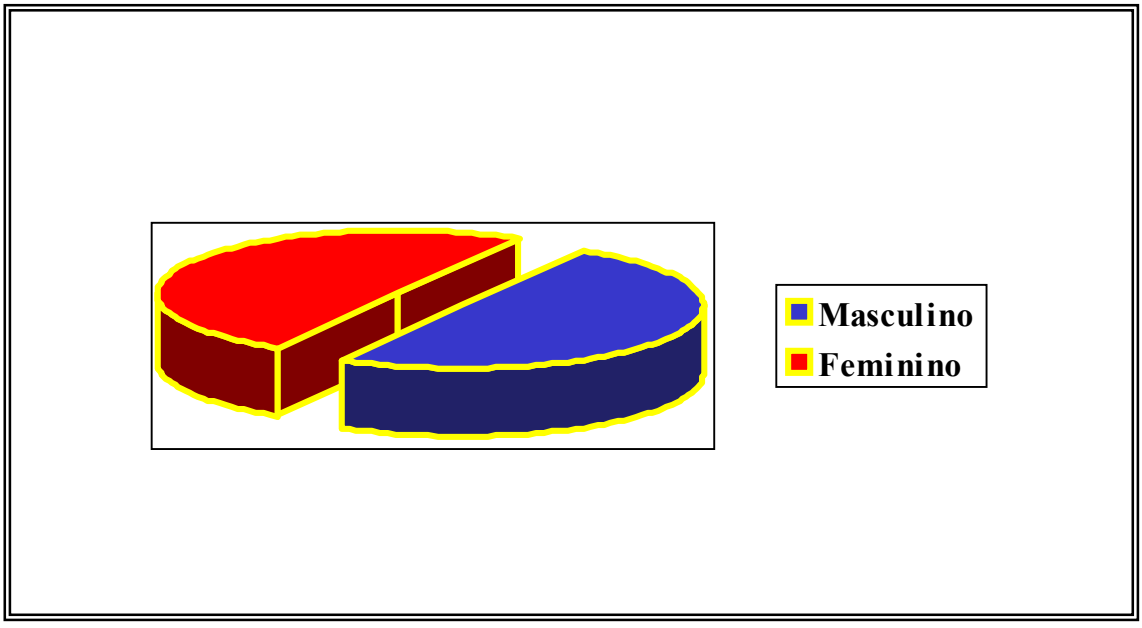


Gráfico 2. Distribuição dos pacientes segundo o sexo

4.1.3. DISTRIBUIÇÃO TOPOGRÁFICA NO ESQUELETO

O tumor praticamente se apresenta em 50% das vezes nos membros inferiores, conforme tabela 3 e gráfico 3.

ESQUELETO APENDICULAR		71,87%
MEMBRO INFERIOR	21	65,62%
FEMUR	12	37,50%
TÍBIA	6	18,75%
FÍBULA	2	6,25%
CALCÂNEO	1	3,12%
MEMBRO SUPERIOR	2	6,25%
ÚMERO	1	6,25%
ESQUELETO AXIAL	9	28,13%
MANDÍBULA	1	3,12%
COSTELA	1	3,12%
VÉRTEBRA	2	6,25%
ESCÁPULA	1	3,12%
CLAVÍCULA	1	3,12%
PÉLVICOS	3	9,37%
TOTAL		100%

Tabela 3. Distribuição topográfica dos tumores estudados

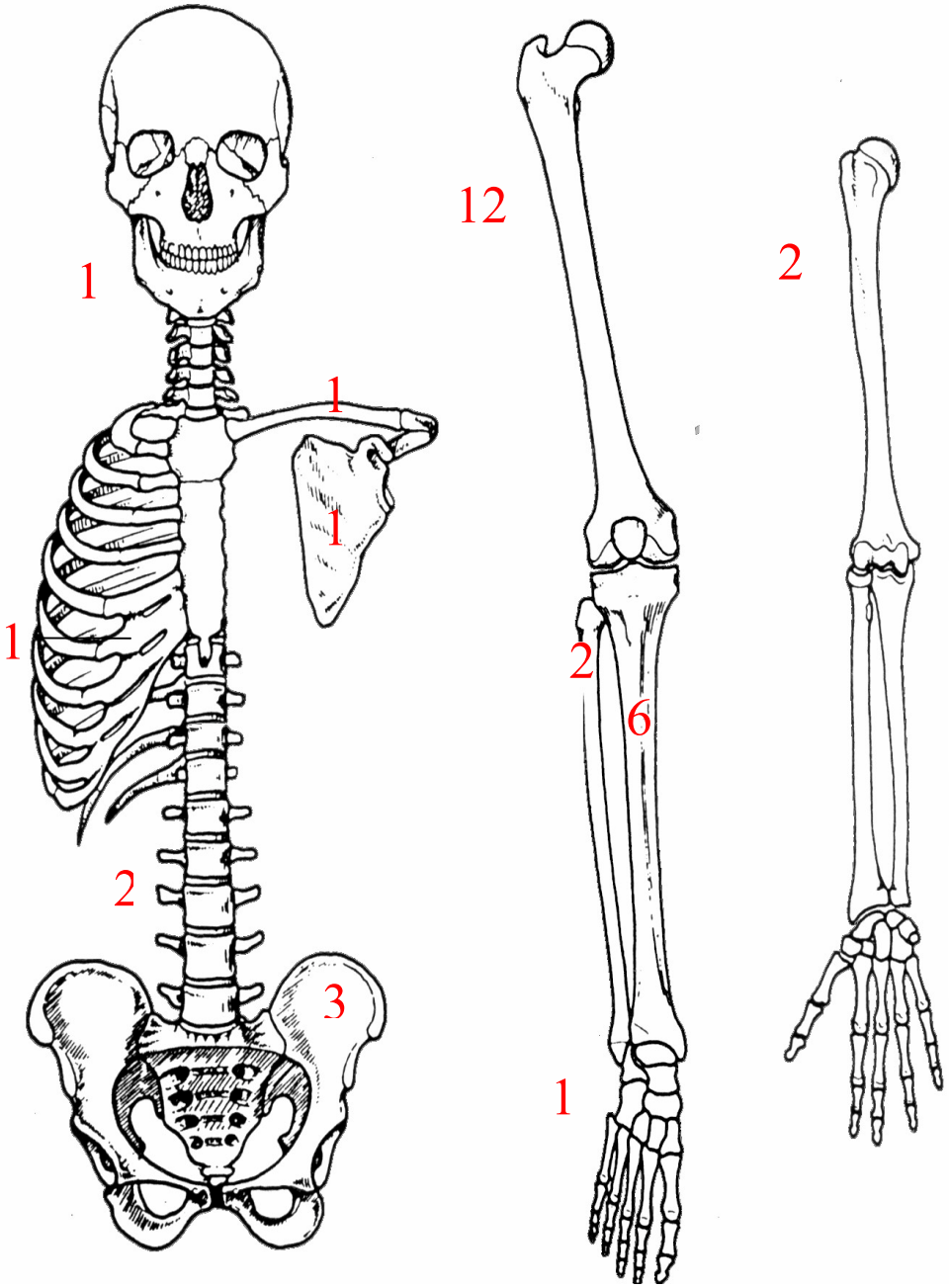


Gráfico 3. Distribuição topográfica dos tumores no esqueleto.

4.1.4. ESTADIAMENTO DOS TUMORES SEGUNDO ENNEKING.

Todos os pacientes foram estadiados segundo o método de Enneking, vide tabela 4 e gráfico 4 abaixo.

ENNEKING	N	%
IIB	27	84,37%
IIIB	5	15,63
TOTAL	32	100 %

Tabela 4. Estadiamento dos tumores estudados segundo Enneking.

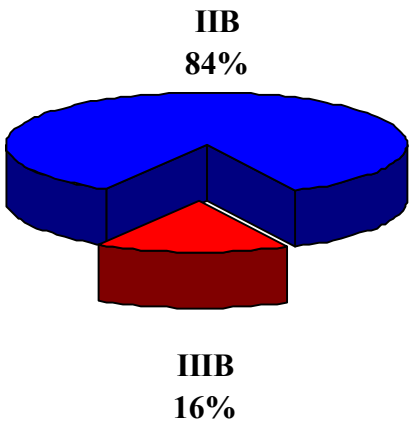


Gráfico 4. Estadiamento dos tumores estudados segundo Enneking ao diagnóstico.

4.1.5. METÁSTASE AO DIAGNÓSTICO

Cinco pacientes apresentaram metástases (pulmonares) ao diagnóstico, vide tabela 5 e gráfico 5 abaixo.

	N	%
AUSENTE	**27**	**84,37**
PRESENTE	**5**	**15,63**
TOTAL	**32**	**100 %**

Tabela 5. Mostra a relação dos pacientes com metástases na época do diagnóstico.

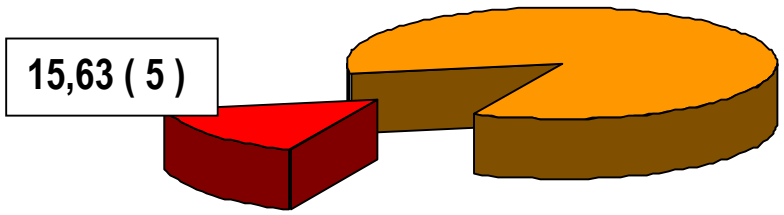


Gráfico 5 . Tradução gráfica de 5 pacientes portadores de metástases ao diagnóstico

4.1.6 AVALIAÇÃO DOS EXAMES DE IMAGEM

Na avaliação dos exames de imagem, os tumores mostraram um padrão semelhante em todos os casos, caracterizado por áreas de lise óssea entremeadas por esclerose de padrão difuso, com quebra da cortical e invasão de partes moles (Figs. 3 e 4). O levantamento periosteal em casca de cebola se observou em cerca de 20% dos casos (Figs. 1 e 2). Não foi avaliado o volume tumoral pelo CT, dado que em alguns pacientes esse exame não foi possível de ser localizado.

A tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética mostraram o tamanho do tumor com o seu crescimento para além dos limites do osso

(Figs.5 e 6).

A cintilografia óssea mostrou-se muito sensível as variações do fluxo sangüíneo no osso acometido (Fig. 7). Os exames de imagem nos deu informações da invasão e crescimento tumoral, foi praticamente uniforme e não forneceu dados que pudessem ser contundentes para a estatística. Essa avaliação foi necessária para complementar o estadiamento de Enneking.

4.1.7 ÓBITO

O tempo de seguimento, foi o mínimo de 2 meses e o máximo de 112 meses com média de 31.15 meses. A tabela 6 e gráfico 6 mostram os pacientes que foram a óbito, por progressão da doença.

EVOLUÇÃO (MESES) (2 - 112) MÉDIA 31.15	PACIENTES	ÓBITOS	METÁSTASE
ATÉ 40	23	15	5
41 – 80	07	02	0
MAIOR QUE 80	02	0	0
TOTAL	32	17	5

Tabela 6. Mostra a evolução dos pacientes divididos a cada 40 meses.

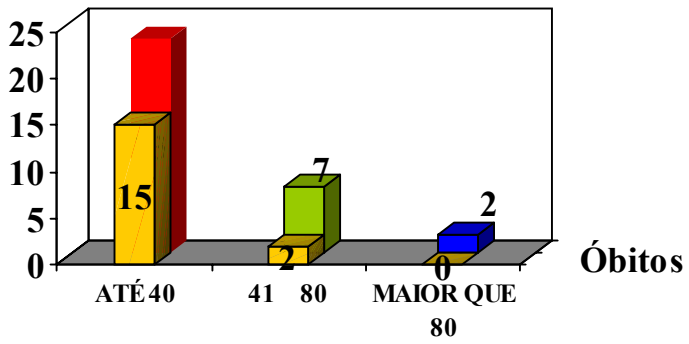


Gráfico 6 Tradução gráfica da tabela 6

4.1.8. AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

Análise anatomopatológica, com lâminas coradas com H&E, mostram aspecto neoplásico, em lençóis densamente celulares, septados por traves fibrosas delicadas. O padrão era uniforme, caracterizado por células pequenas ovaladas, arredondadas, com citoplasma escasso, núcleo central, redondos com cromatina dispersa e nucléolos pouco evidentes. Os demais casos mostraram células de maior tamanho e pleomorfismo presente. Quadro 7 e gráfico 7 (Figs. 8 e 9).

RESULTADO RELATIVO A O PADRÃO CELULAR

PADRÃO CELULAR	N	%
TÍPICO	**26**	**81,25**
ATÍPICO	**06**	**18,75**
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 7. Freqüência da presença da atipia tumoral avaliada no estudo

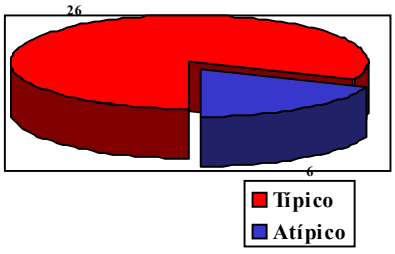


Gráfico 7. Tradução gráfica da tabela 7.

4.1.8.a –PRESENÇA DE ROSETAS DE HOMER-WRIGHT

Encontramos as rosetas presentes em 7 casos. Tabela 8 e Gráfico 8. (Fig.11)

	N	%
PRESENTES	**07**	**21,87**
AUSENTES	**25**	**78,13**
TOTAL	**32**	**100%**

Tabela 7. Freqüência da presença de rosetas Homer-Wright ao diagnóstico

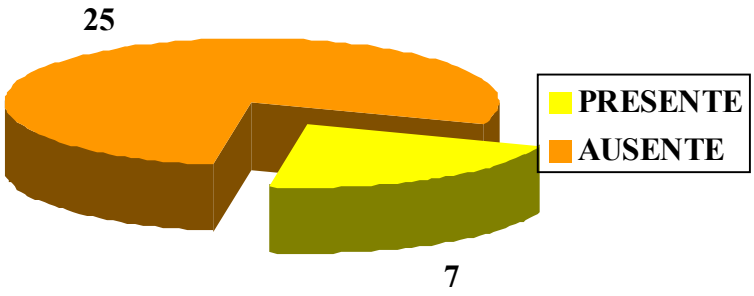


Gráfico 7 . Tradução gráfica da tabela 7.

4.1.8.b. NECROSE TUMORAL ESPONTÂNEA

O grau de necrose tumoral espontânea, encontrada no material examinado por ocasião da biópsia, foi analisado em 28 casos.(Fig.12).

	N		%
PRESENTE	**21**	**(1A + 1B)**	**75**
AUSENTE	**07**		**25**
NÃO AVALIADOS	**04**		**00**
TOTAL	**32**		**100**

Tabela 8. Freqüência da necrose expontânea ao diagnóstico. Os 4 casos não avaliados, não dispunham de material suficiente para a avaliação completa em todos os campos

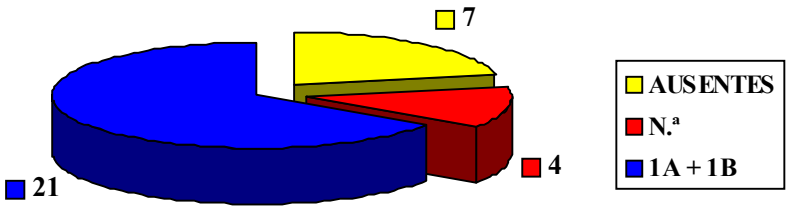


Gráfico 8A . Mostra a freqüência da necrose espontânea ao diagnóstico.

4.1.8.c – MITOSE

O número de mitoses variou de 2 à 22, por 10 campos de maior aumento, em 30 pacientes avaliados. O índice mitótico variou segundo a tabela e gráfico abaixo.

ÍNDICE MITÓTICO	N	%
MENOR QUE 1	28	92,85
IGUAL OU MAIOR QUE 1	02	7,14
NÃO AVALIADAS	02	00
TOTAL	32	100

Tabela 9. Freqüência dos pacientes com presença de mitoses por campo no diagnóstico

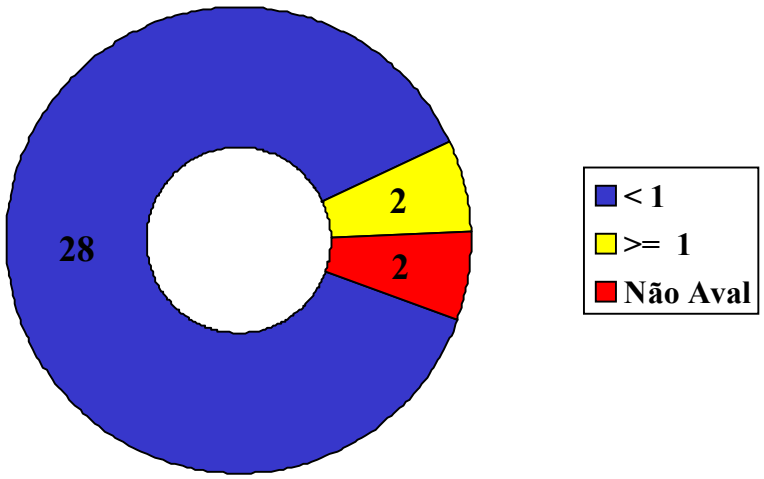


Gráfico 9A . Tradução gráfica da tabela 9.

4.1.9.HISTOQUÍMICA

4.1.9.a.Avaliação do glicogênio citoplasmático através da reação pelo PAS , esteve presente em 53,12% dos casos vide tabela 10 e gráfico 10. (Fig.14).

PAS	N	%
PRESENTE	17	53,12
AUSENTE	15	46,88
TOTAL	32	100%

Tabela 10. Mostra a freqüência de casos positivos a reação pelo PAS.

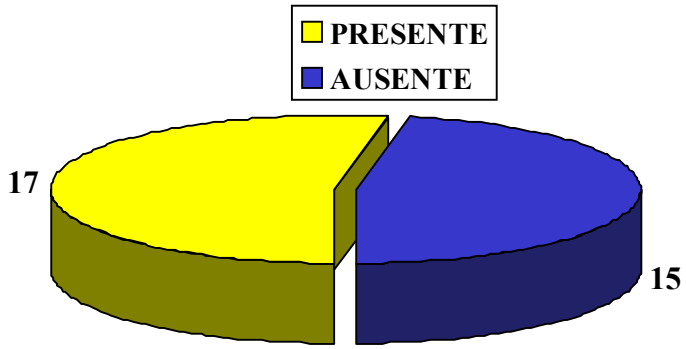


Gráfico 10A . Tradução gráfica da reação do PAS nos pacientes avaliados.

4.1.9.b. Avaliação da fibras de reticulina mostrou a presença da mesma apenas junto às traves fibroconjuntivas vascularizadas, mas não envolvendo as células tumorais. (Fig.14).

4.1.10. AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

O resultado do estudo imuno-histoquímico, usando os 12 anticorpos, estão agrupados na tabela . A interpretação dos resultados foram**:**

4.1.10.a. N.S.E. (Fig.15).

N.S.E.	**N**	**%**
PRESENTE	**11**	**34,37**
AUSENTE	**21**	**65,63**
TOTAL	**32**	**100%**

Tabela 11. Distribuição dos pacientes na reação imunohistoquímica da NSE.

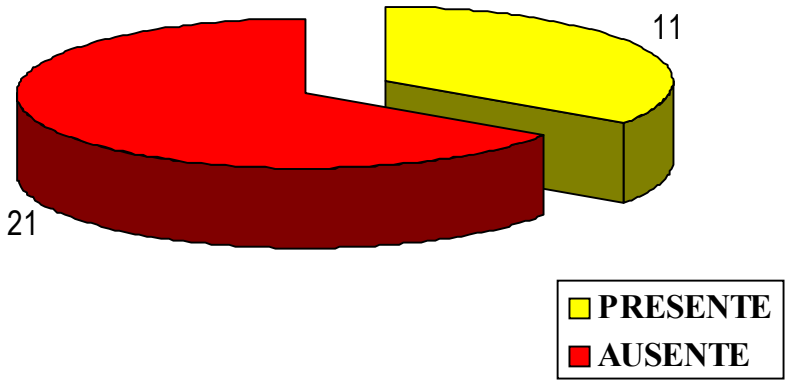


Gráfico 11 A Gráfico da distribuição dos pacientes a reação da NSE.

4.1.10.b. PROTEÍNA S-100. (Fig. 16).

S-100	N	%
PRESENTE	**08**	**25**
AUSENTE	**24**	**75**
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 12. Distribuição dos pacientes segundo a reação pela proteína S-100.

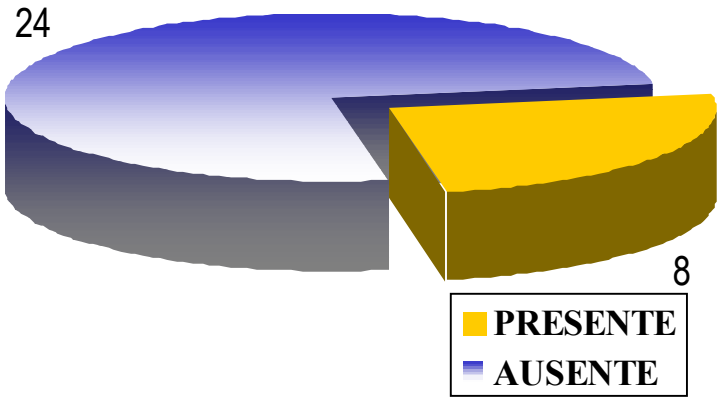


Gráfico 12 . Tradução gráfica da distribuição dos pacientes na reação da proteína S-100.

4.1.10.c. VIMENTINA (VIM). (Fig.17).

VIMENTINA	N	%
PRESENTE	**24**	**75**
AUSENTE	**08**	**25**
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 13. Distribuição dos pacientes segundo reação ao antígeno Vimentina.

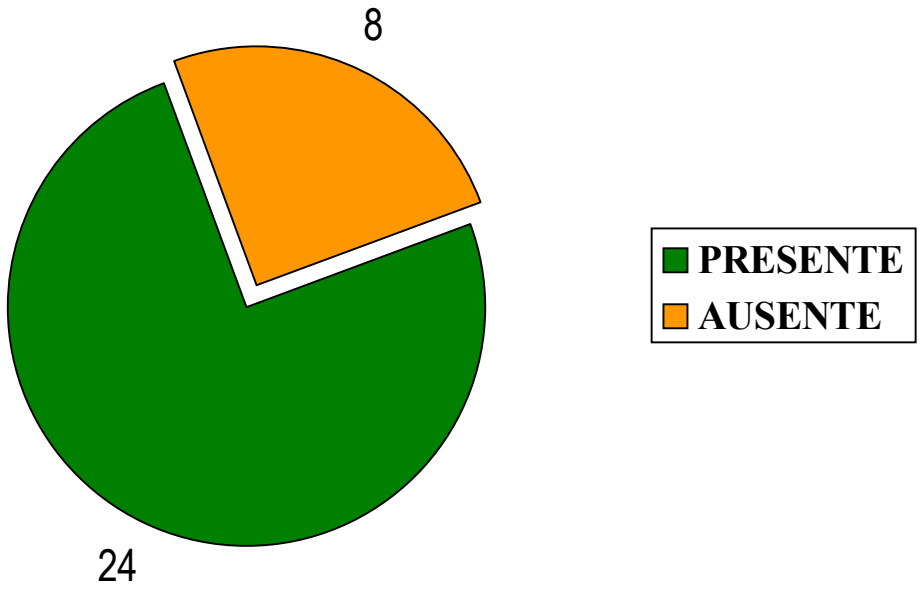


Gráfico 13 . Tradução gráfica da distribuição dos pacientes na reação ao antígeno Vimentina.

4.1.10.d ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO COMUM.

L.C.A	N	%
PRESENTE	0	0,00
AUSENTE	32	100
TOTAL	32	100

Tabela 14. Distribuição dos pacientes segundo a positividade para o L.C.A.

4.1.10.e. CAM 5.2 (CITOQUERATINA)

CAM. 5.2	N	%
PRESENTE	03	09,37
AUSENTE	29	90,63
TOTAL	32	100%

Tabela 15. Freqüência dos pacientes quanto a positividade para citoqueratina Cam 5.2 .

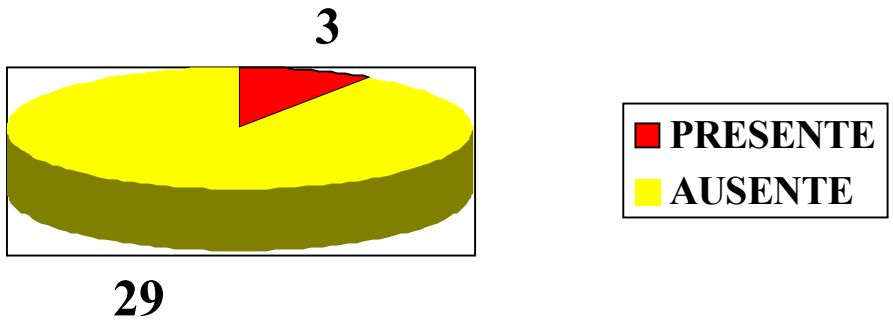


Gráfico 15 . tradução gráfica da tabela 15.

4.1.10.f LEU-7. (Fig.18).

LEU-7	**N**	**%**
PRESENTE	**03**	**09,37**
AUSENTE	**29**	**90,63**
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 16. Distribuição dos pacientes quanto a presença do Leu-7.

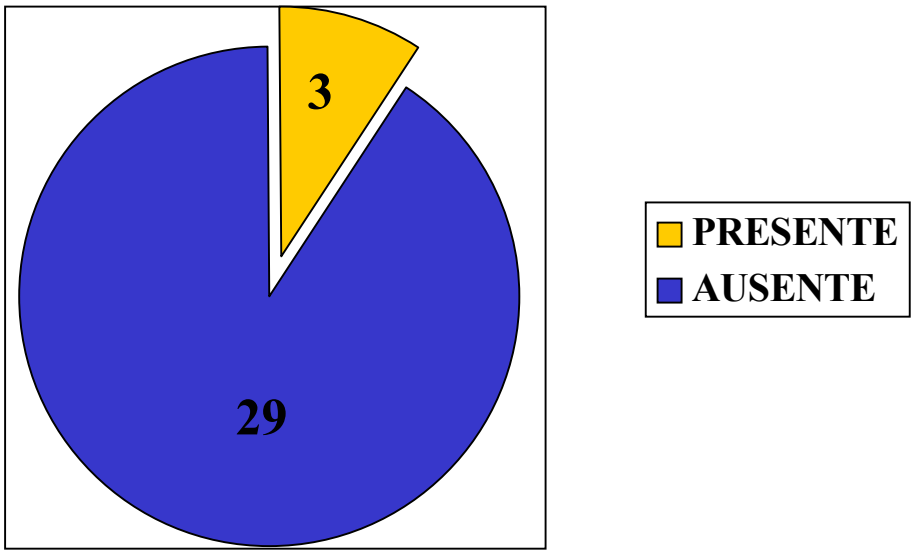


Gráfico 16 . Distribuição dos pacientes quanto a reação do Leu-7.

4.1.10.g. NEUROFILAMENTO

NEUROFILAMENTO	N	%
PRESENTE	01	03,12
AUSENTE	31	96,88
TOTAL	32	100

Tabela 17. Freqüência dos pacientes segundo a reação ao Neurofilamento.

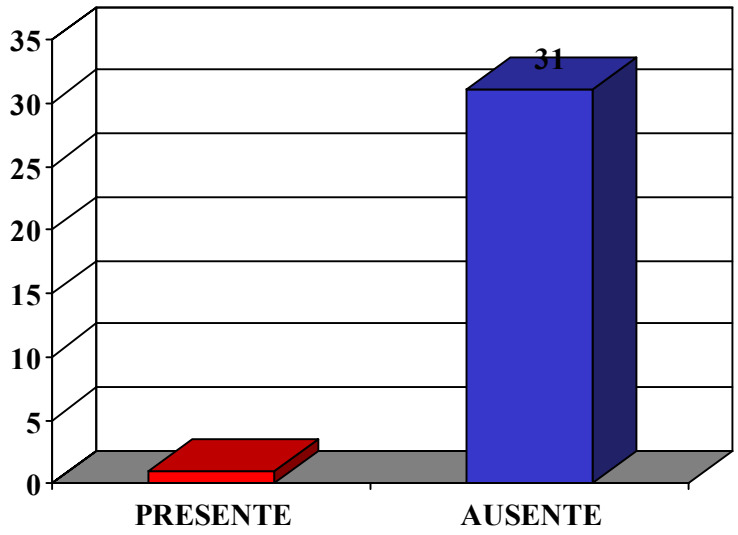


Gráfico 17. Tradução gráfica da tabela 17.

4.1.10.h. C.G.R. (CROMOGRANINA) (Fig.19)**.**

C.G.R.	N	%
PRESENTE	**14**	**43,75**
AUSENTE	**18**	**56,25**
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 18. Freqüência dos pacientes relacionados com a presença da Cromogranina.

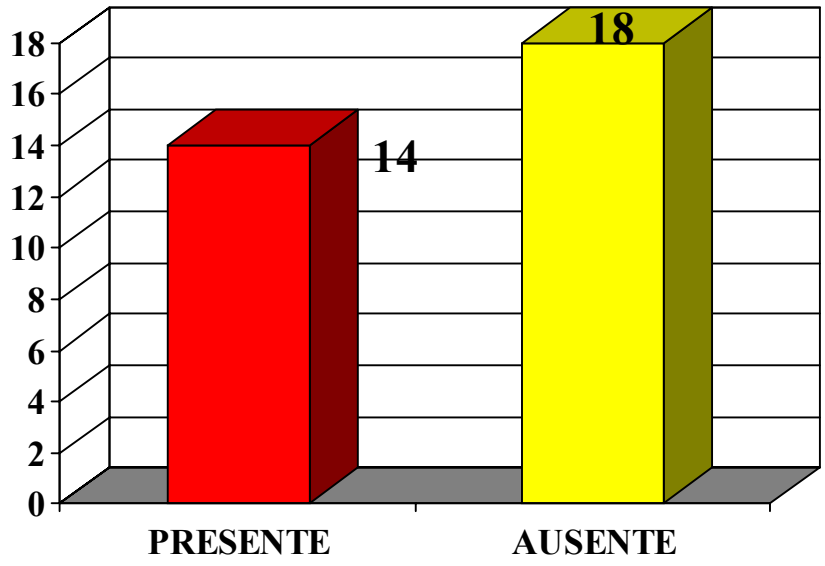


Gráfico 18. Tradução gráfica da tabela 18.

4.1.10.i. SYN. (SINAPTOFISINA) (Fig.20)**.**

SYN.	N	%
PRESENTE	**07**	**21,87**
AUSENTE	**25**	**78,13**
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 19. Distribuição dos pacientes segundo a reação pela Sinaptofisina.

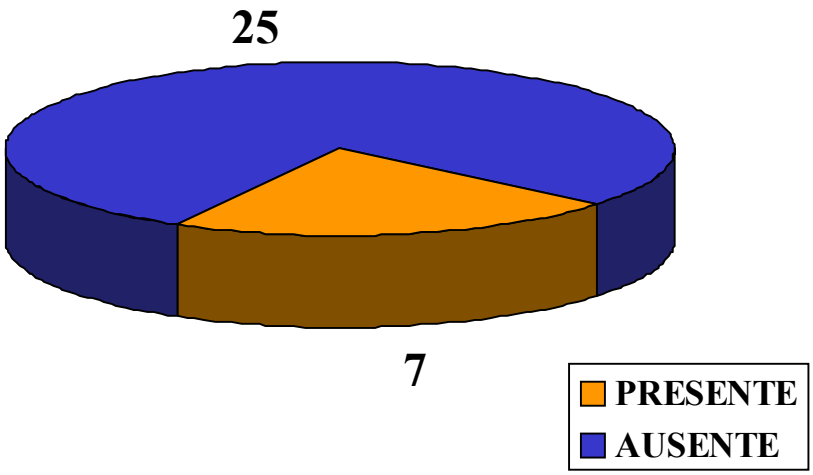


Gráfico 19. Distribuição dos pacientes segundo reação com Sinaptofisina.

4.1.10.j. GFAP (PROTEÍNA GLIAL FIBRILAR)

GFAP	N	%
PRESENTE	04	12,5
AUSENTE	28	87,5
TOTAL	32	100

Tabela 20. Freqüência da reação a proteína glial fibrilar.

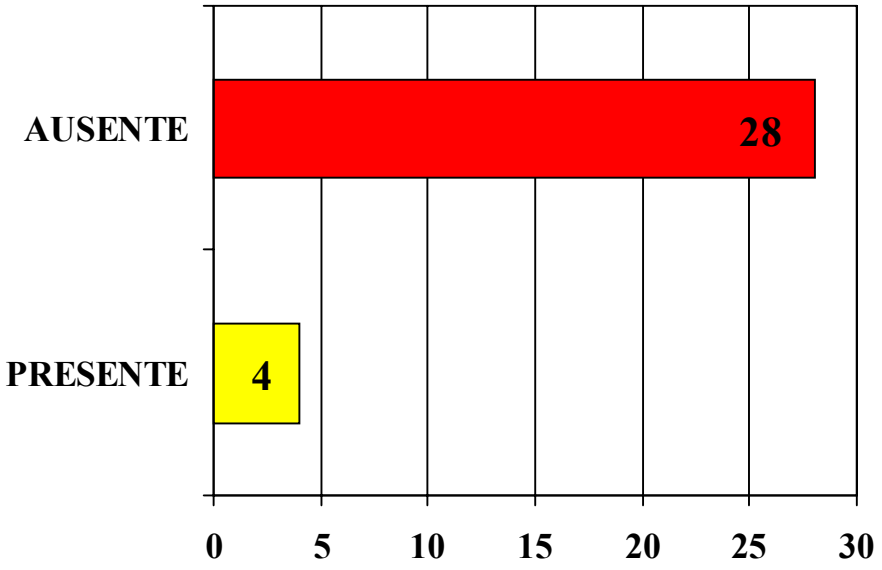


Gráfico 20 A. Tradução gráfica da tabela 20.

4.1.10.k. BCL-2

BCL –2	N	%
PRESENTE	02	06,25
AUSENTE	30	93,75
TOTAL	32	100

Tabela 21. Freqüência dos casos com relação ao marcador BCL-2.

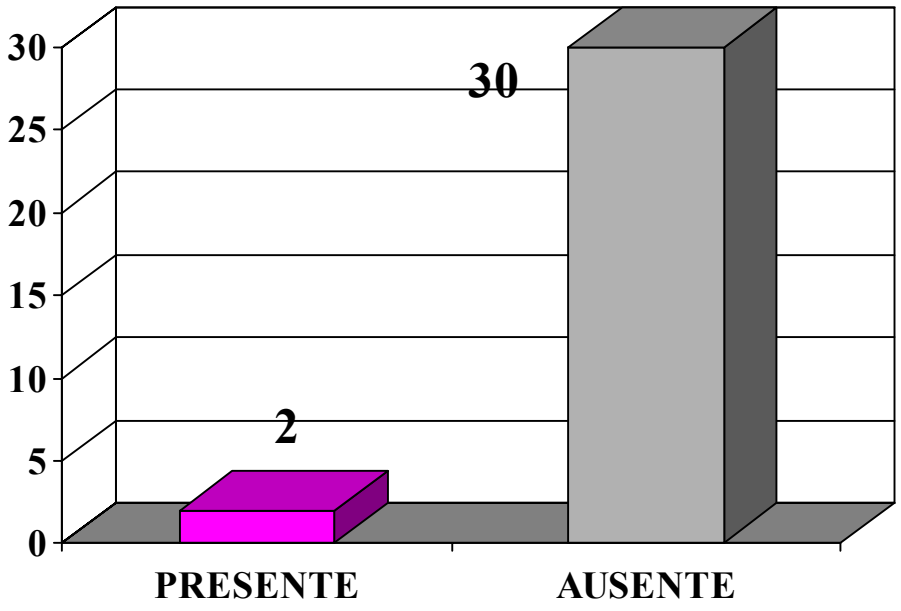


Gráfico 21A. Mostra a tradução gráfica da tabela 21.

4.1.10.l. CD99 (HBA 71) (Fig.21)**.**

MIC-2	N	%
PRESENTE	**23**	**71,87**
AUSENTE	**09**	**28,13**
TOTAL	**32**	**100**

Tabela 22. Mostra a distribuição da reação ao CD99.

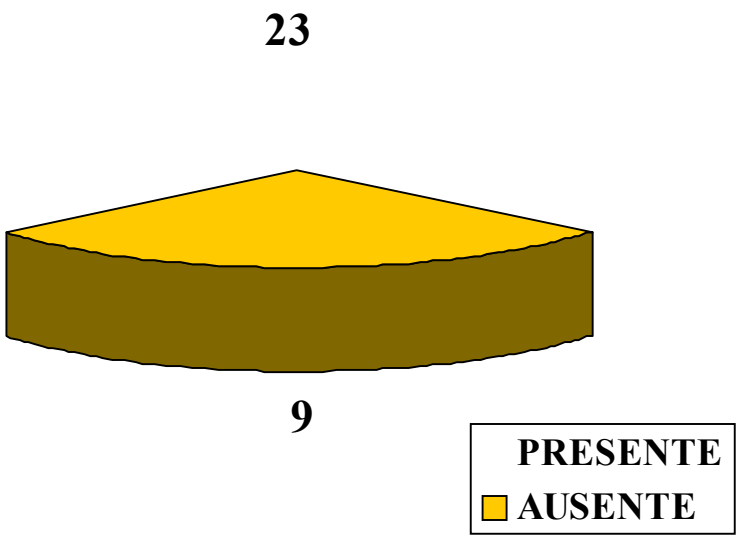


Gráfico 22. Mostra a tradução gráfica da reação ao CD99.

4.2 CORRELAÇÃO ANÁTOMOCLÍNICA

4.2.1. IDADE

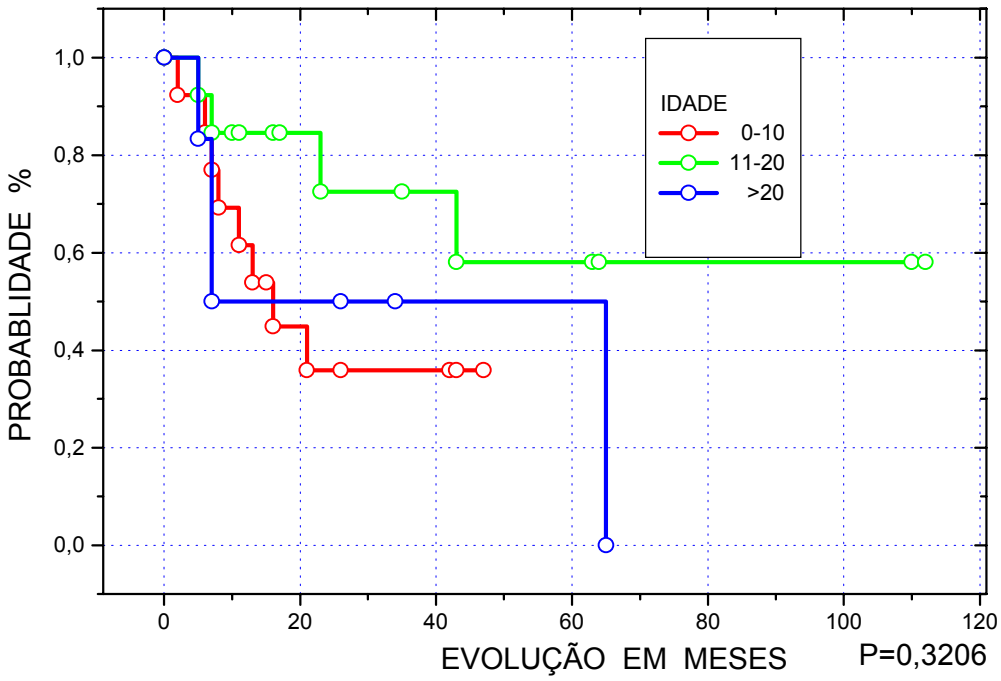


Gráfico 23. Análise estatística da idade e correlação com a sobrevida.

4.2.2 LOCALIZAÇÃO TOPOGRÁFICA

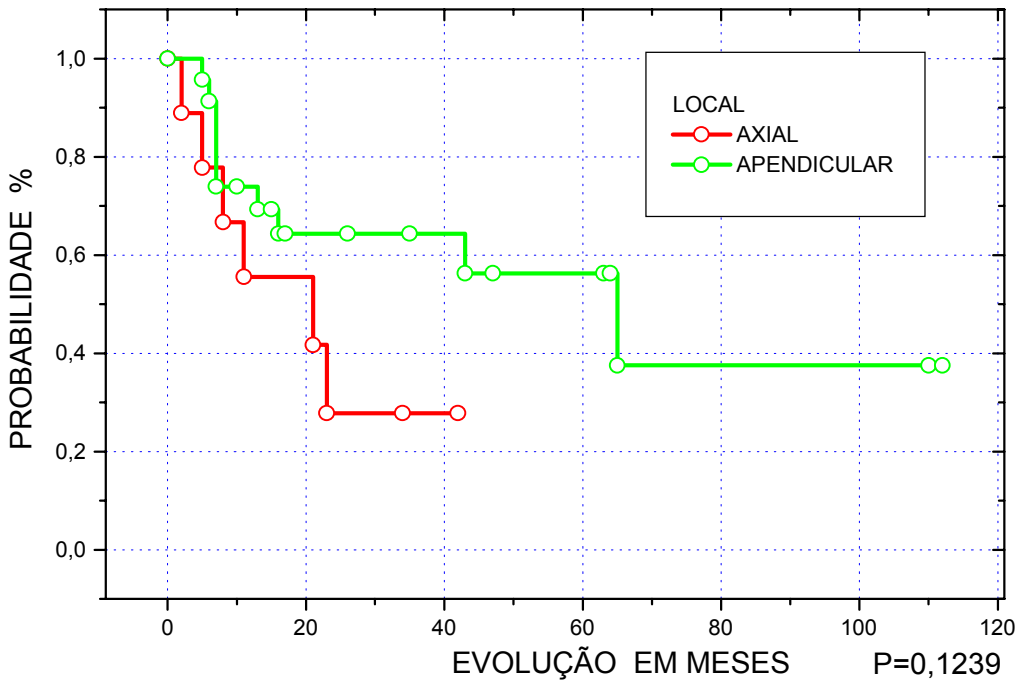


Gráfico 24. Correlação entre a localização do tumor e sobrevida. Embora o p não significativo, observa-se através do gráfico uma tendência da piora prognóstica quando comprometido o esqueleto axial.

4.2.3. ESTADIAMENTO DOS TUMORES SEGUNDO ENNEKING.

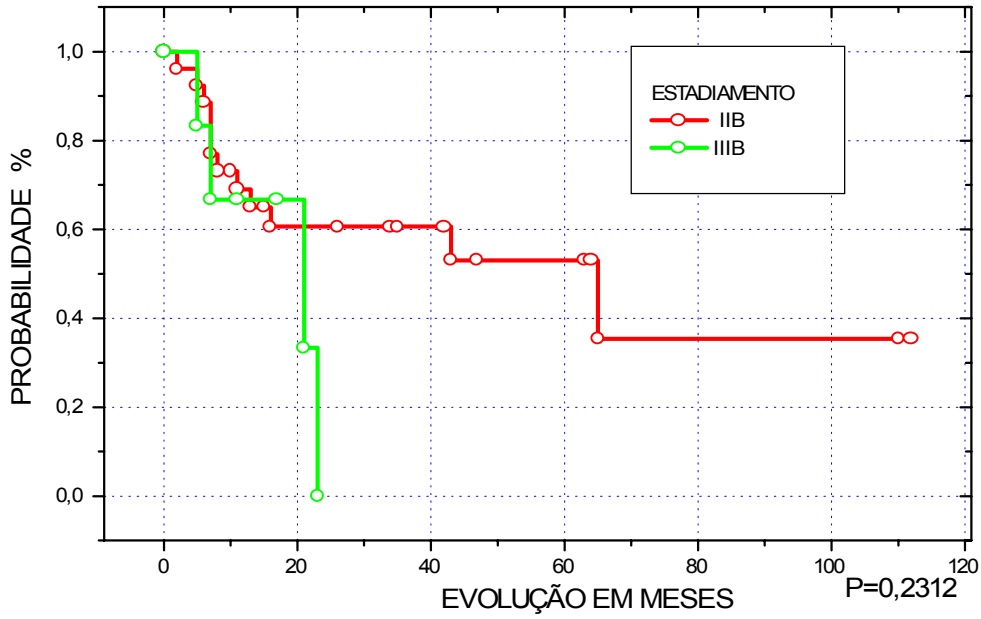


Gráfico 24. O gráfico mostra a avaliação do grau de Enneking e a sobrevida. Há uma tendência à piora do prognóstico quando a graduação aumenta.

4.2.4. METÁSTASE AO DIAGNÓSTICO.

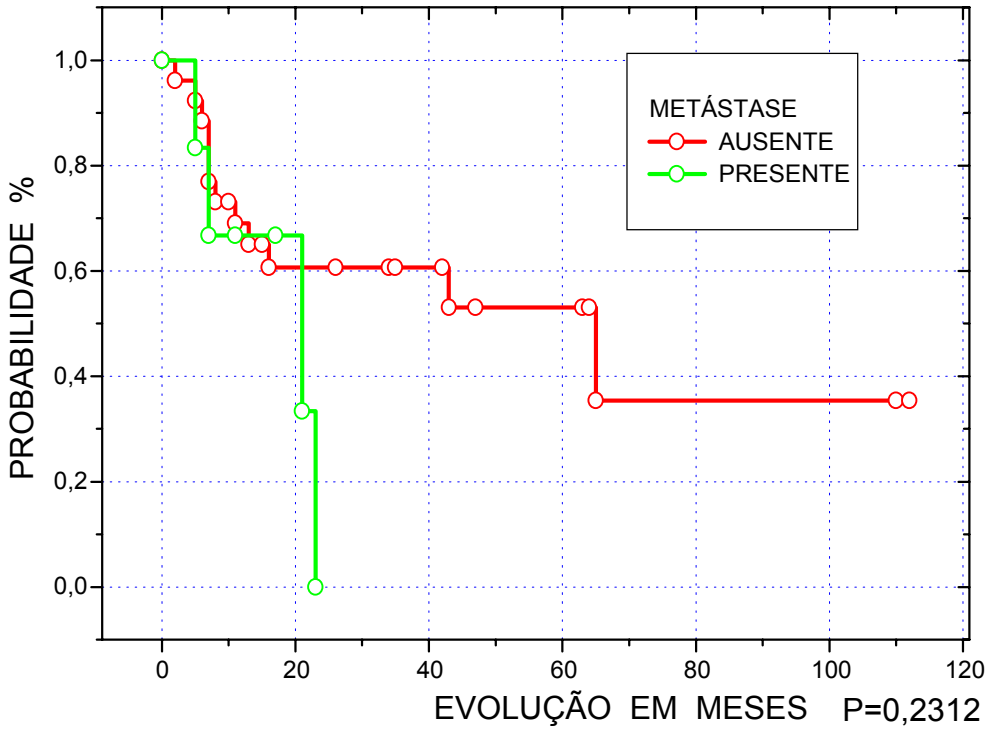


Gráfico 25. A correlação entre metástase ao diagnóstico e sobrevida, evidencia uma tendência ao mau prognóstico.

4.2.5. ATIPIA CELULAR.

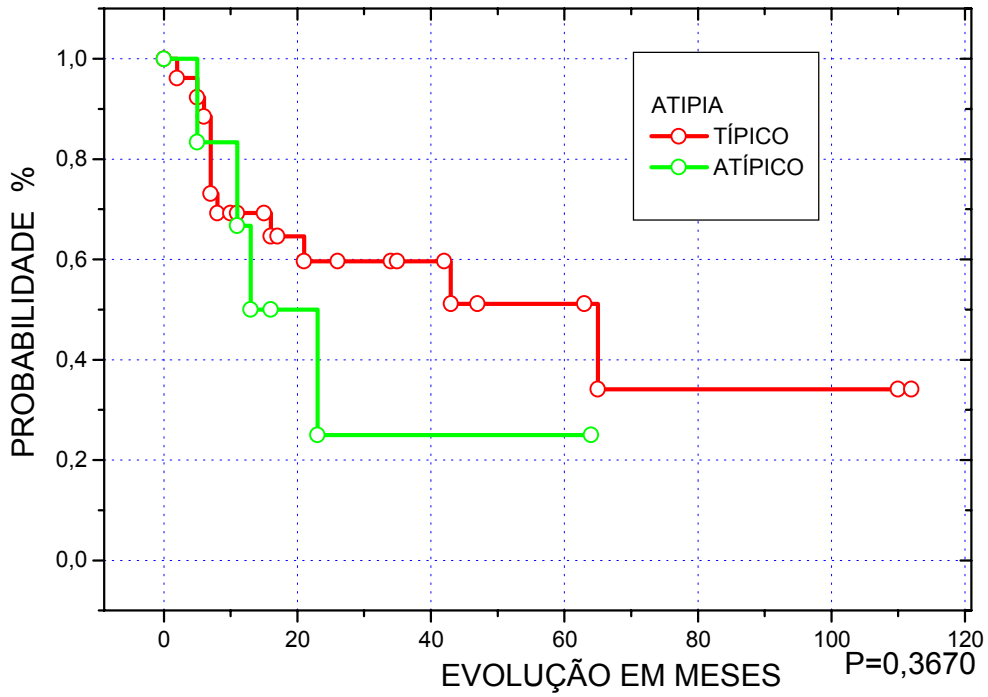


Gráfico 26. A análise estatística, não mostra correlação entre atipia celular e o prognóstico.

4.2.6. ROSETAS DE HOMER WRIGHT.

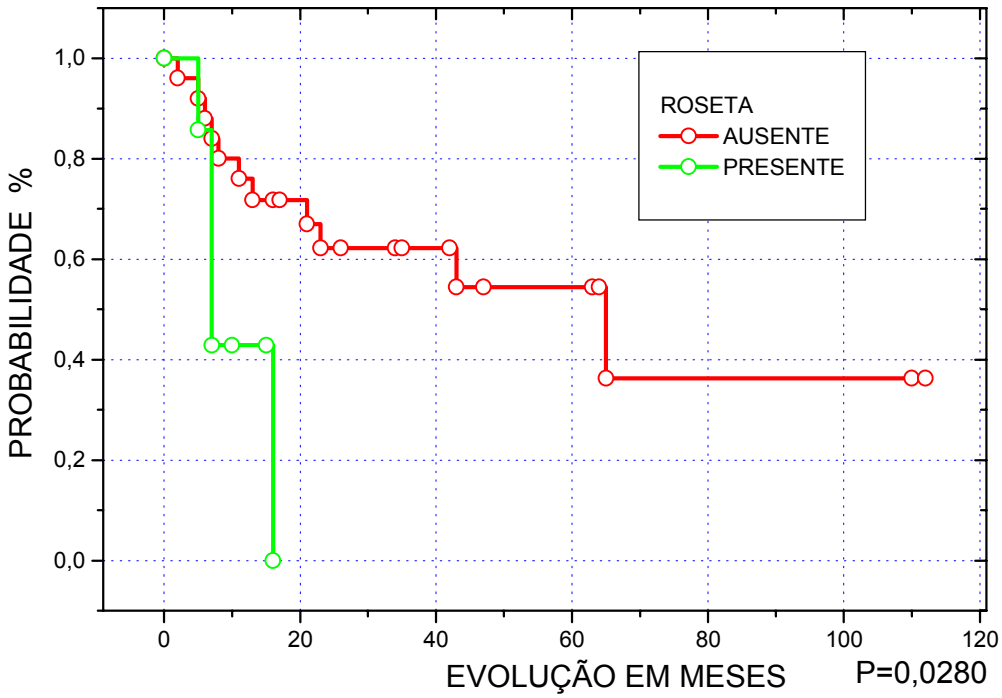


Gráfico 27. Correlação da presença de rosetas de Homer-Wright e sobrevida. (A presença de rosetas verdadeiras mostrou-se como um fator importante e foi considerado o marcador morfológico mais significativo neste estudo).

4.2.7 NECROSE TUMORAL ESPONTÂNEA.

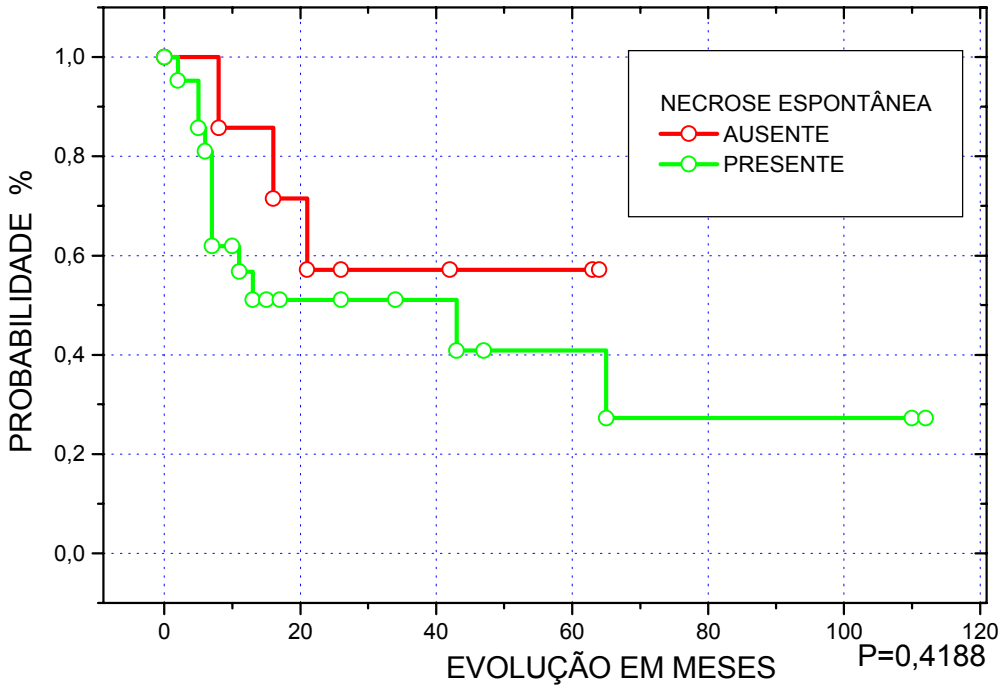


Gráfico 28. O gráfico mostra a correlação entre necrose tumoral espontânea e sobrevida. Na nossa análise não se mostrou significativa.

4.2.8 MITOSE

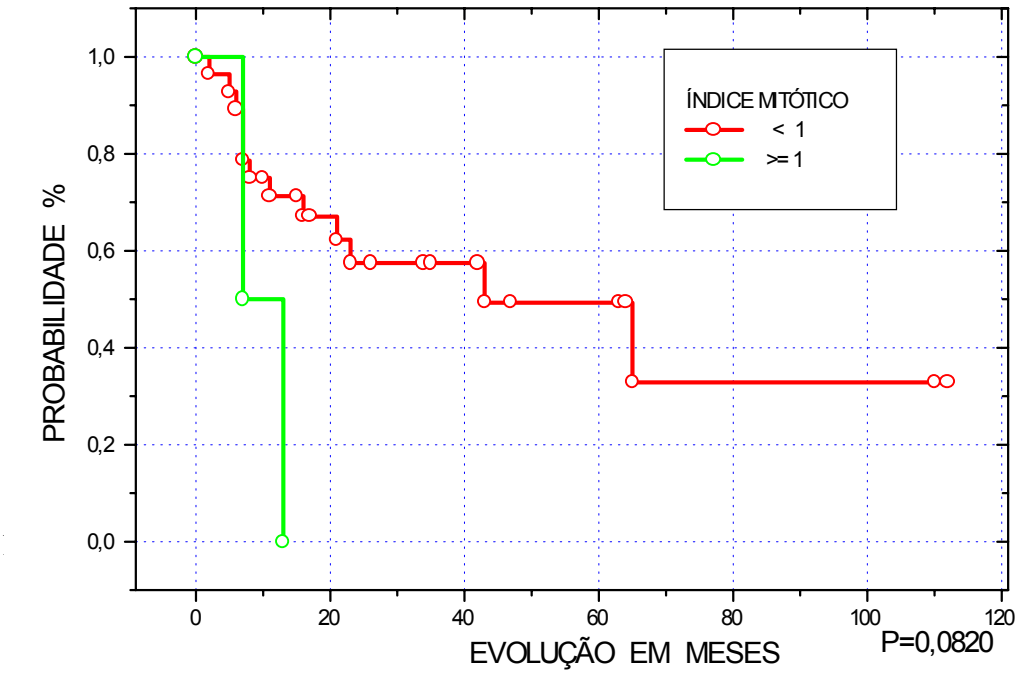


Gráfico 29. O gráfico mostra tendência a piora do prognóstico com o índice mitótico >= 1.

4.2.9. GLICOGÊNIO INTRACITOPLASMÁTICO.

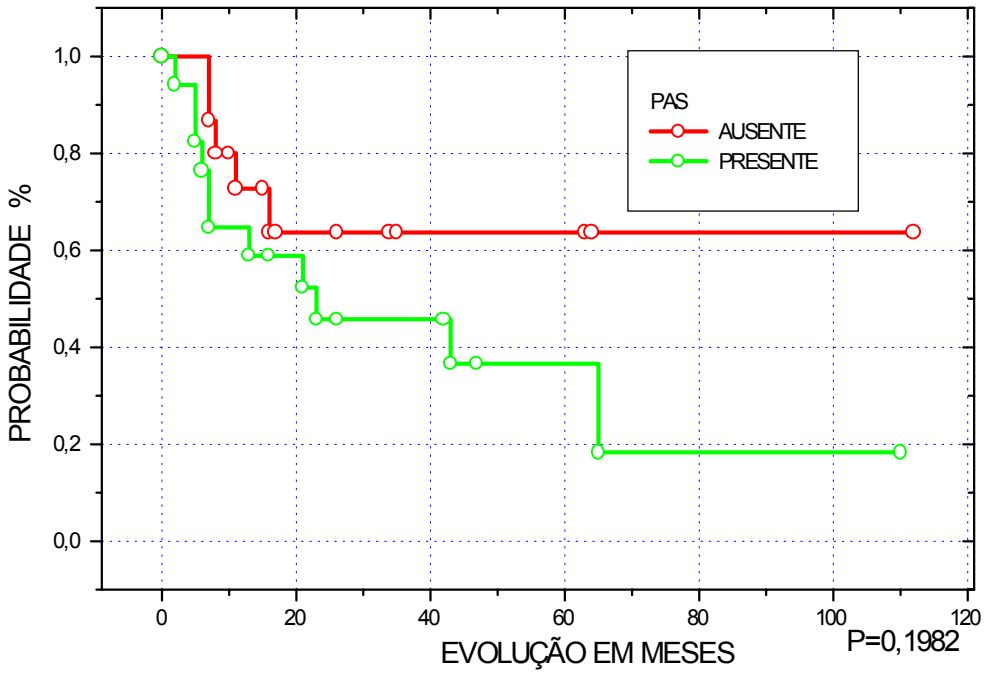


Gráfico 30. O gráfico mostra a correlação da reação pelo PAS e sobrevida. Não se observa qualquer significância.

4.2.10.CORRELAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA E SOBREVIDA.

4.2.10.A. N.S.E.

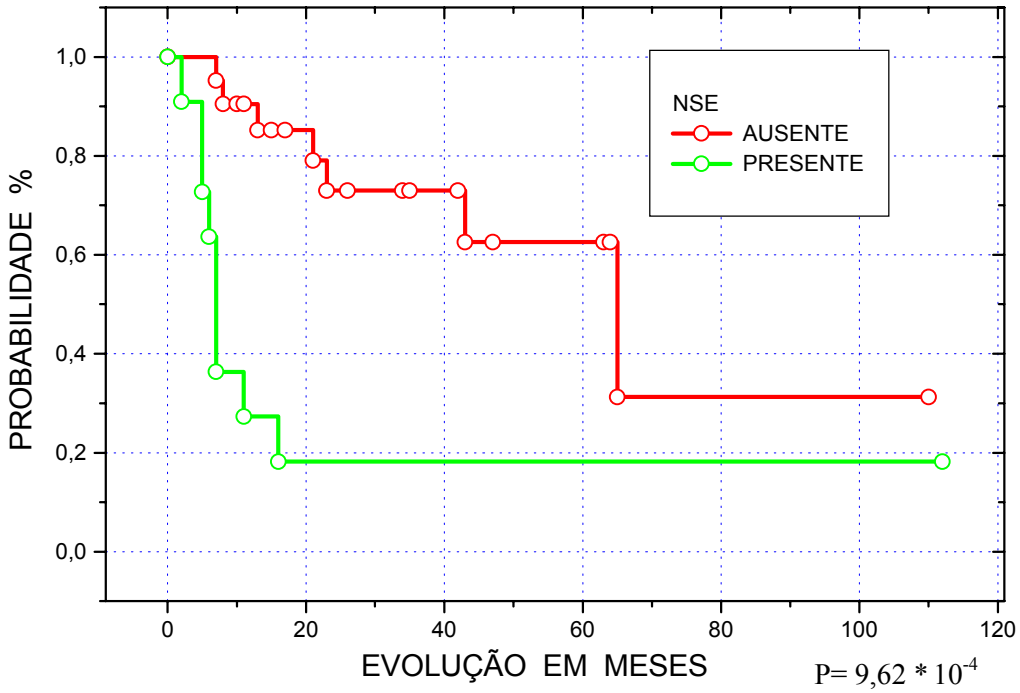


Gráfico 31. Observa-se significância notória entre esse marcador de diferenciação neural e a evolução prognóstica.

4.2.10.B PROTEÍNA S-100.

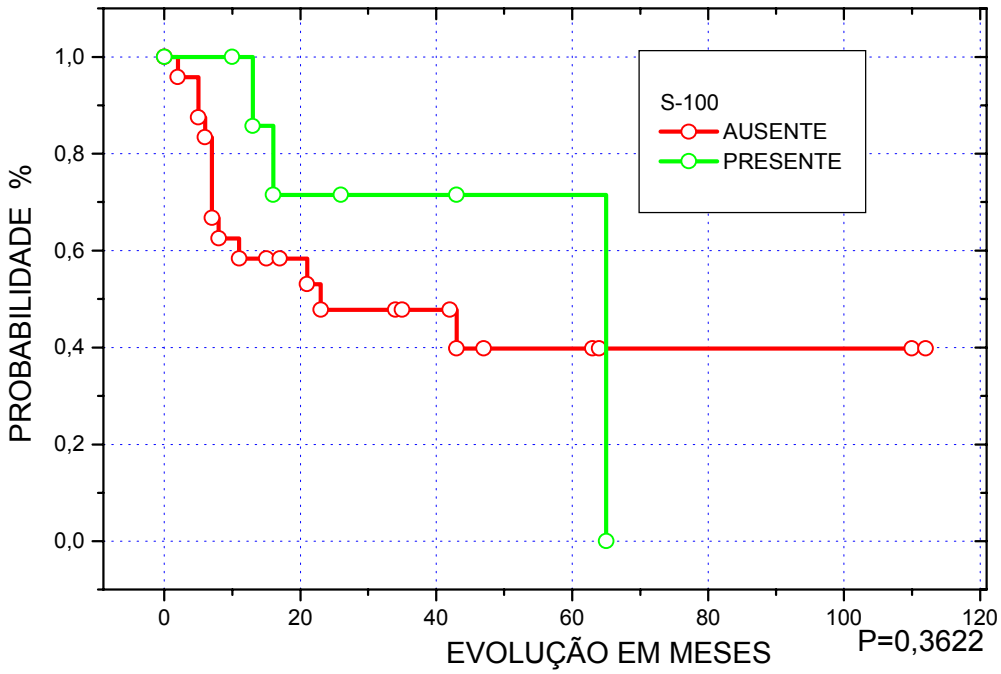


Gráfico 32.O gráfico mostra que a correlação anatomopatológica entre a proteína S-100 e sobrevida.

4.2.10.C. VIMENTINA.

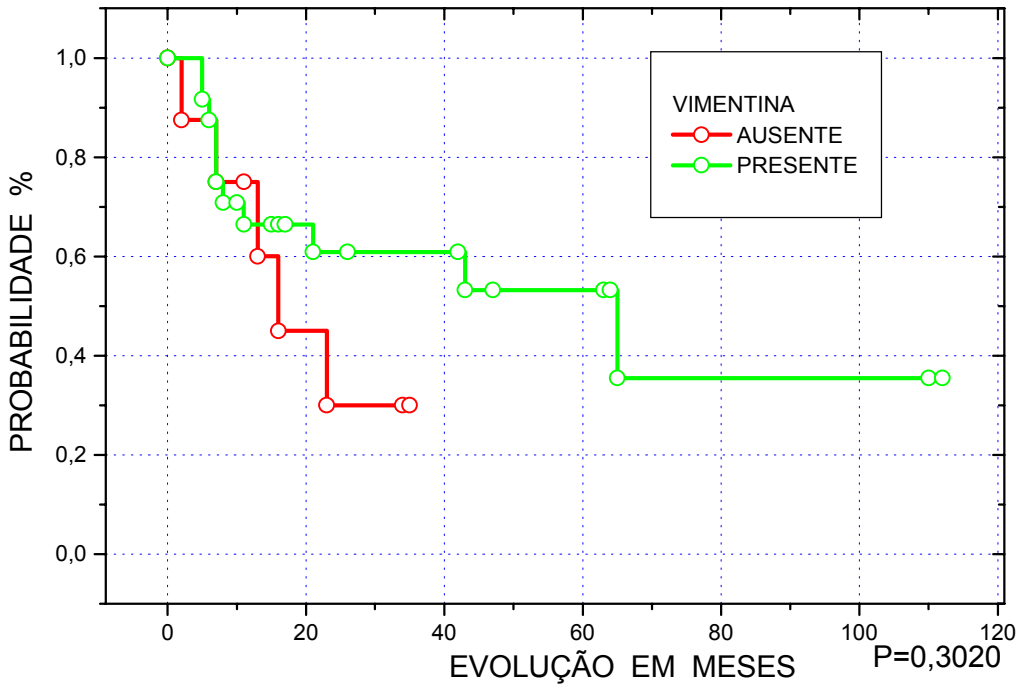


Gráfico 33. O gráfico mostra que a relação da Vimentina com o prognóstico não teve significância.

4.2.10.D. CAM 5.2.

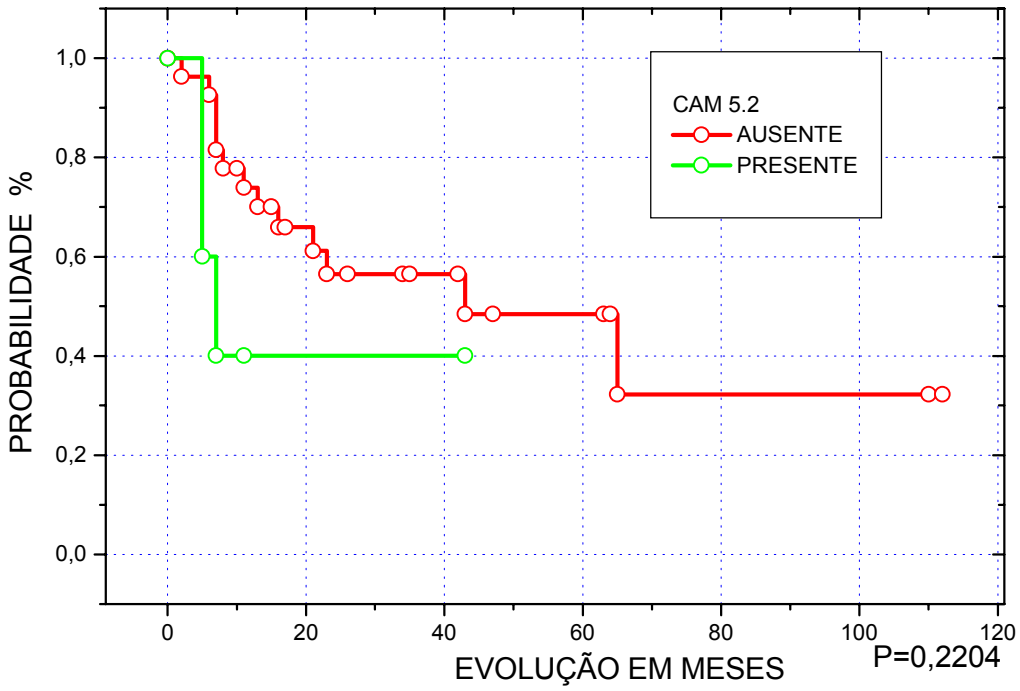


Gráfico 34. O gráfico mostra que a positividade para a citoqueratina não é significativa.

4.2.10.E LEU-7.

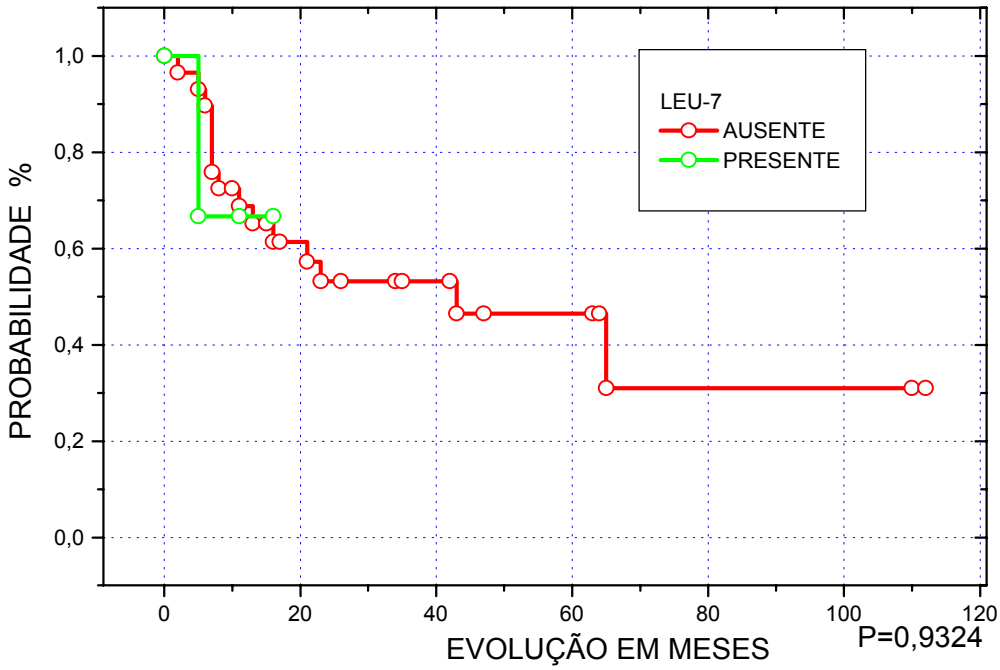


Gráfico 35. O gráfico mostra que a relação entre o prognóstico e a presença do Leu-7, não foi signifcativa.

4.2.10.F. CROMOGRANINA.

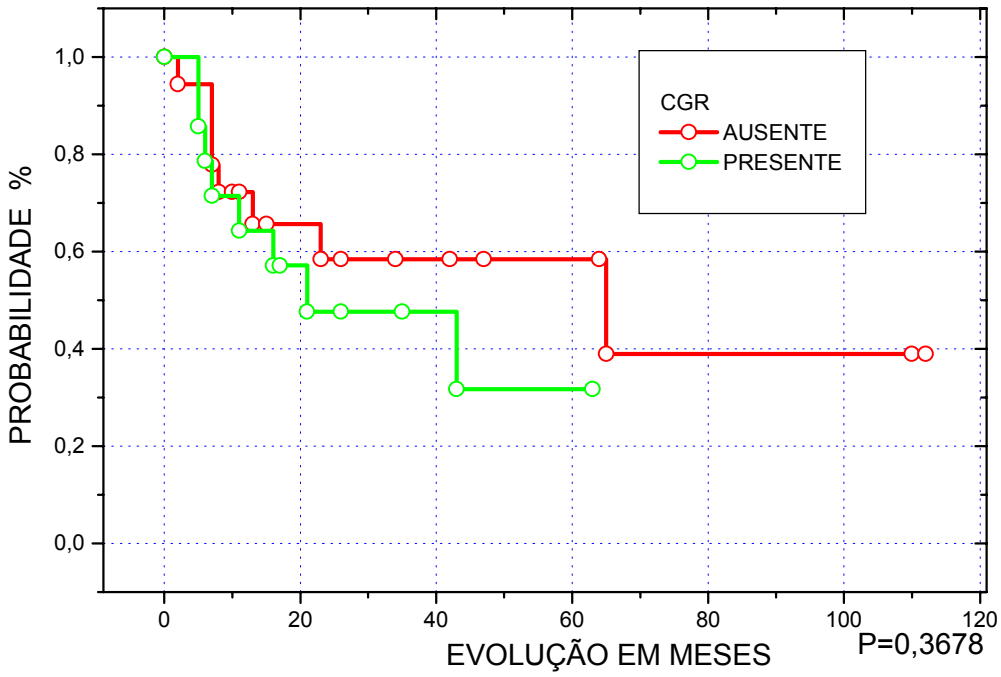


Grafico 36. O gráfico mostra correlação entre a sobrevida e presença de cromogranina. Na nossa análise não se mostrou significativa.

4.2.10.G. SINAPTOFISINA.

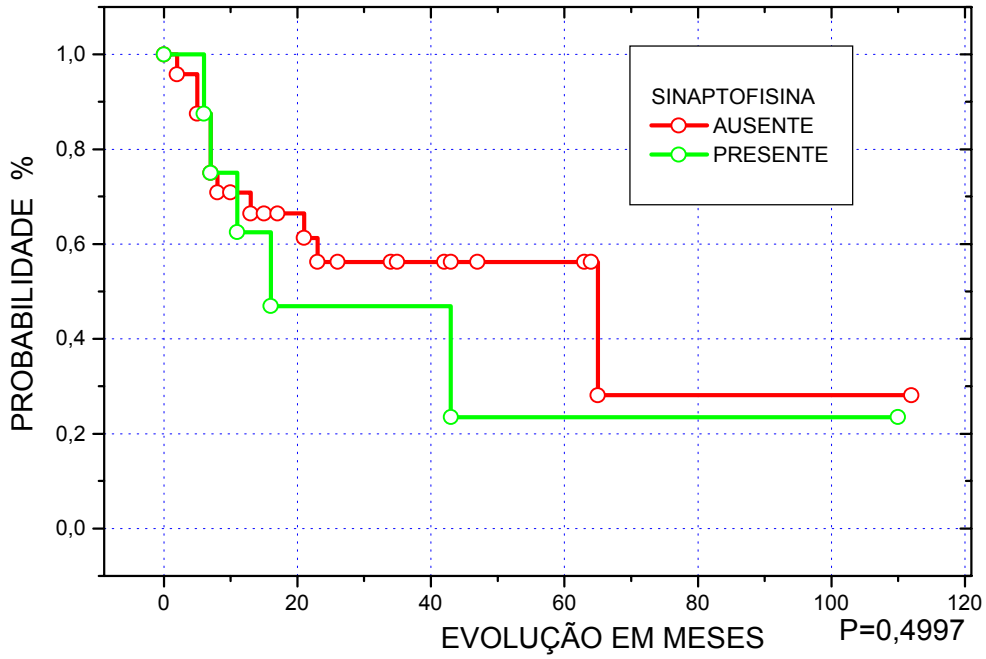


Gráfico 37. O gráfico mostra relação entre a sinaptofisina e a sobrevida. Não se mostrou significativa.

4.2.10. H GFAP

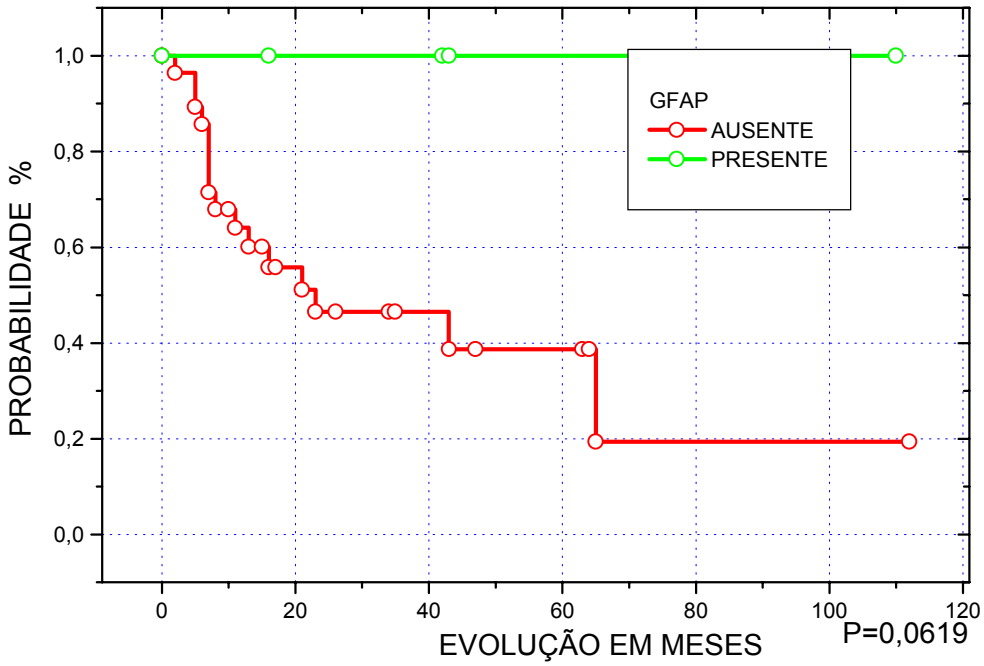


Gráfico 38. O gráfico mostra que a presença do GFAP não tem influência significativa com o prognóstico.

4.2.10.I. BCL-2

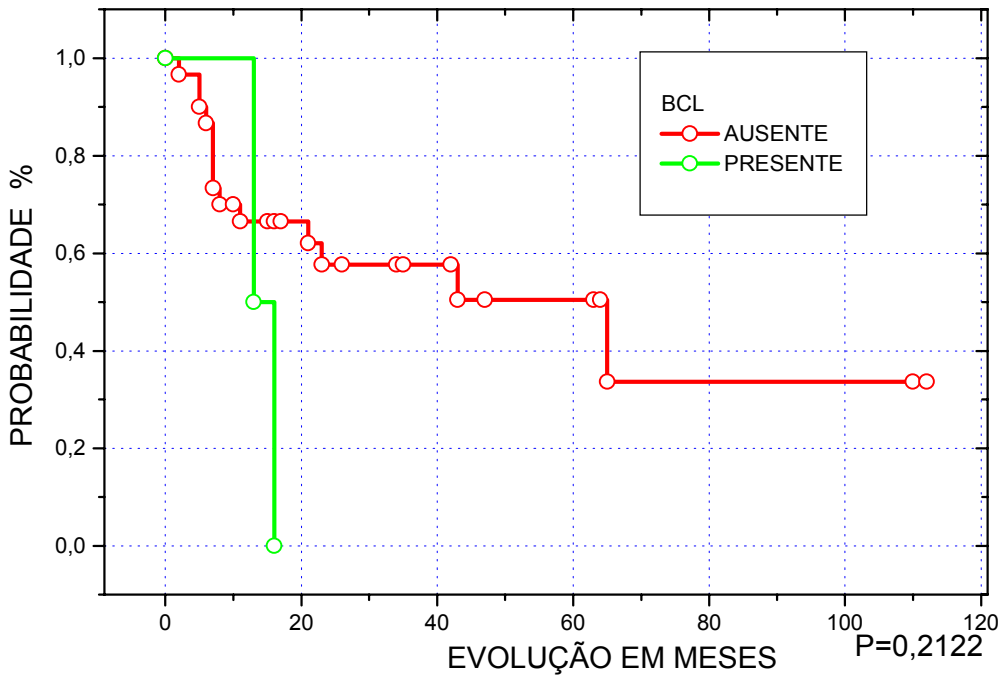


Gráfico 39. O gráfico mostra que a presença do BCL-2 não teve significância com o prognóstico.

4.2.10.J. CD99 (MIC-2).

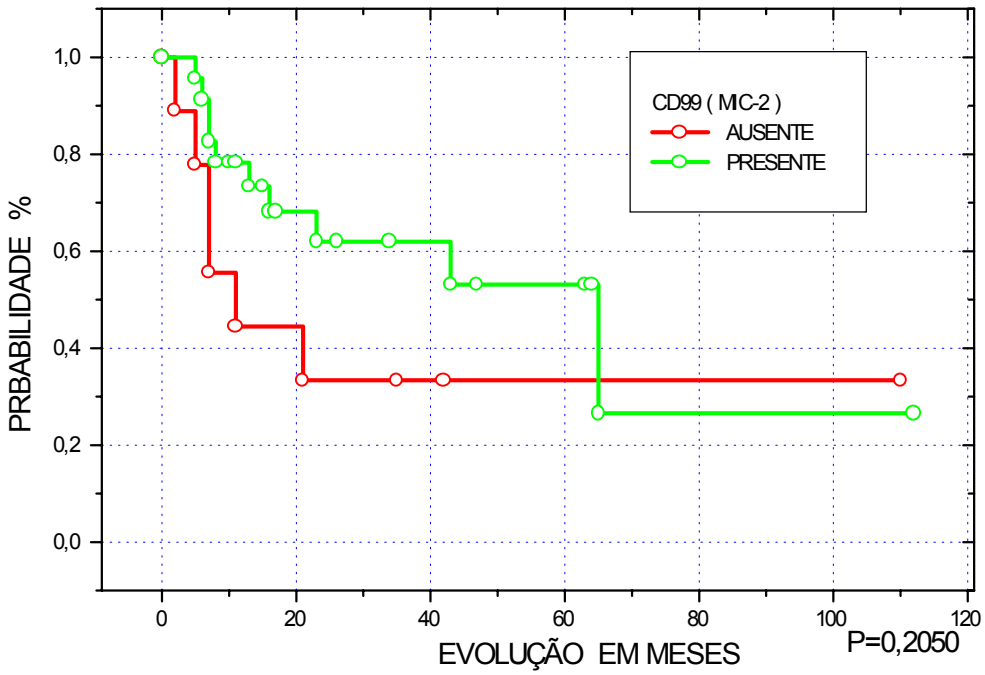


Gráfico 40. O gráfico mostra que a correlação entre o a presença do CD99 e prognóstico, não foi significativa.

4.1.11 CORRELAÇÃO NATOMOCLÍNICA COM O ÍNDICE DE DIFERENCIAÇÃO NEURAL. (IDN).

A- Índice de Diferenciação Neural:

Na avaliação pelo teste de Kaplan-Meyer, a variável independente considerada foi a sobrevida, e a morte como variável dependente, e com base nessas duas variáveis testamos a relação estabelecida com a avaliação clínica, achados histológicos do tumor (necrose, mitose, roseta e atipia celular) , com cada anticorpo.

Alguns anticorpos que mostraram que a sua presença ou ausência estava correlacionada com prognóstico ruim,(p= 0,05) foram agrupados e avaliados na regressão multivariada de Cox.

Utilizou-se para cálculo o método de eliminação " backward conditional " de estatística Wald, com coeficiente de significância 0,05, como limite de retirada de variáveis.

Em todas as correlações que fizemos na avaliação prognóstica dos resultados obtidos pelo nosso estudo, certamente os mais importantes foram os fatores que mostram a diferenciação neural do Sarcoma de Ewing, presença de rosetas verdadeiras de Homer Wright, considerada um marcador morfológico, e a expressividade imunohistoquímica do N.S.E..

Esses marcadores foram tão categóricos como fatores do mau prognóstico, que confeccionamos um Índice de Diferenciação Neural, (I.D.N.), graduado de 0 a II,

conforme a tabela abaixo.(vide tabela 23). Na aplicação deste índice em nossa casuística, ele se mostrou muito significativo estatisticamente, onde o pior prognóstico estava sempre relacionado com o grau II.(Gráfico 41).

	GRAU 0	**GRAU I**	**GRAU II**
ROSETAS	AUSENTE	APENAS UM DOS DOIS MARCADORES	PRESENTE
N.S.E.	AUSENTE	PRESENTES	PRESENTE

Tabela 23. Mostra a quantificação do Índice de Diferenciação Neural.

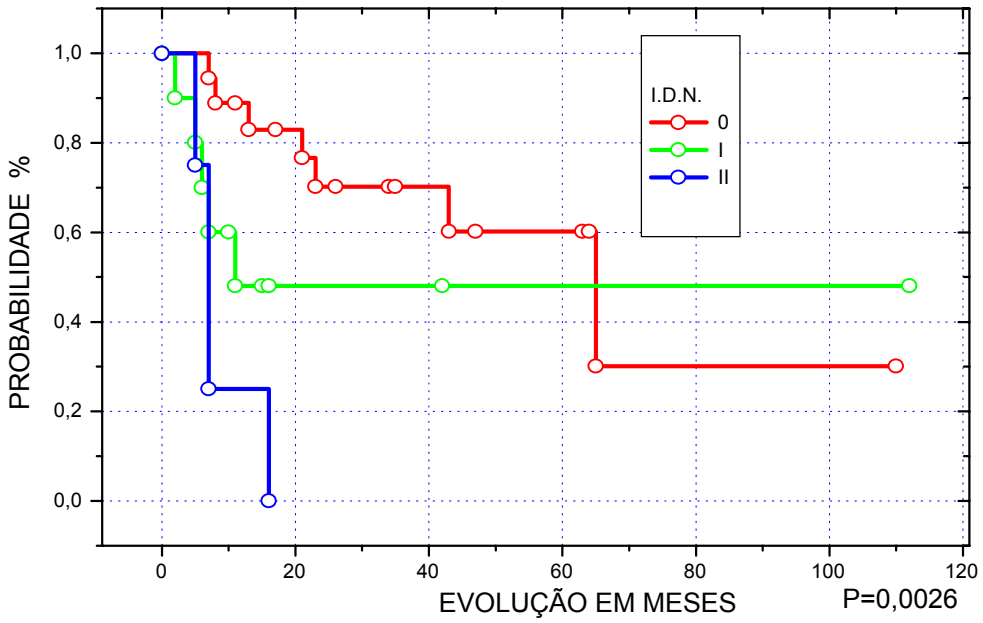


Gráfico 41.O gráfico mostra a análise estatística da aplicação do I.D.N. na nossa casuística mostrando ser este índice altamente significativo, com piora do prognóstico à medida que ele aumenta em graduação de 0-II.

4.1.11. CORRELAÇÃO DO IDN E OUTROS ACHADOS DE IMPORTANCIA PROGNÓSTICA NA LITERATURA.

Para testarmos a estabilidade estatística deste índice (IDN), usamos um artifício estatístico chamado BOOTSTRAP, que permite avaliar grupos de pacientes com número pequeno (N). Fizemos 100 grupos de 32 pacientes sorteados aleatoriamente do grupo principal. Correlacionamos com achados de relevancia prognóstica na literatura(necrose tumoral espontânea, localização no esqueleto axial). Obtivemos o seguinte resultado: (vide tabela abaixo)

I.D.N.	94%
TOPOGRAFIA TUMORAL	47%
METÁSTASE	31%
NECROSE	28%

Tabela 23. A tabela mostra o resultado do teste de BOOTSTRAP, onde aplicado à regressão Cox Mantel. Nos 100 conjuntos formados, a presença do IDN foi extremamente significativa, aparecendo em 94% dos conjuntos, seguidos pela localização no esqueleto axial do tumor, metástase ao diagnóstico e necrose tumoral espontânea.

.

Com os resultados da tabela acima, fizemos um índice global de sobrevida (IGS), no qual somamos à presença do IDN os fatores prognósticos relevantes na literatura, e que na nossa casuística tiveram uma tendência ao mau prognóstico (localização no esqueleto axial, metástase, necrose espontânea tumoral). Com esses dados o IGS foi graduado da seguinte forma: grau 0, na completa ausência desses fatores, do grau I ao III, pela somatória de cada um desses fatores . O IGS tem graduação até o III, porque na avaliação Cox, acima da somatória de 3 ou mais fatores, correlacionado com prognóstico, o valor do p era o mesmo (p= 0,005).

I.G.S.	PACIENTES	ÓBITOS	%
0	05	0	0
I	10	5	50
II	09	5	55
III	08	6	75

Tabela 24. A tabela mostra a aplicabilidade do IGS (Índice Global da Sobrevida) nos 32 pacientes da nossa série, notar que porcentagem dos óbitos é maior à medida do aumento da sua graduação.

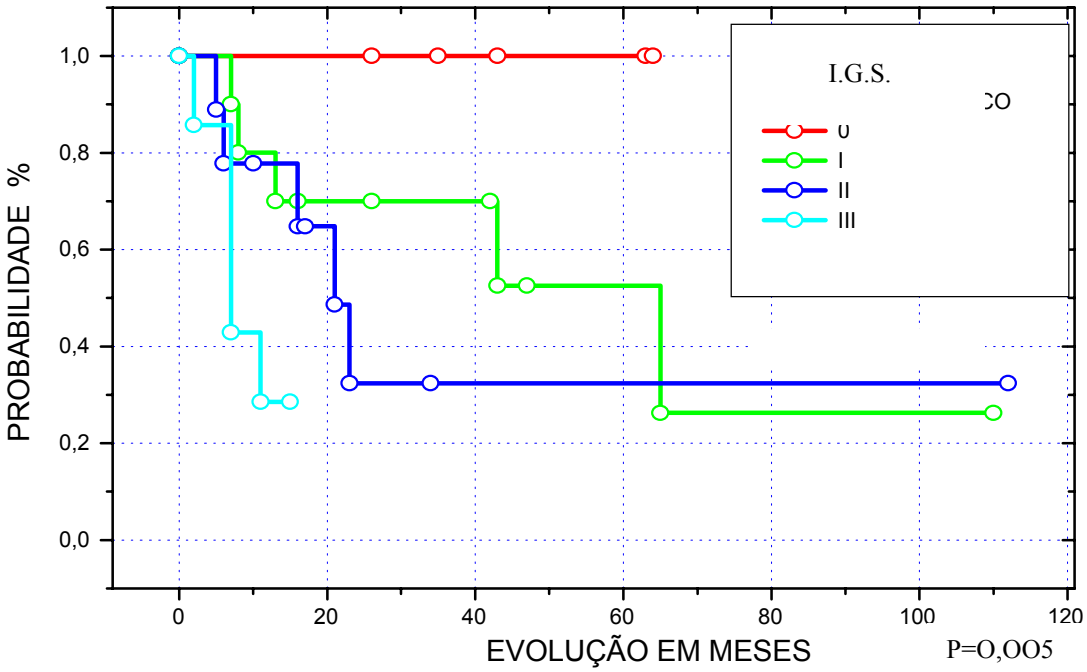


Gráfico 42. O gráfico mostra a influencia do IGS, na sobrevida dos nossos pacientes. Notar que o aumento da graduação piora o prognóstico.

ILUSTRAÇÕES

Fig. 1. Caso 31 Radiografia simples do fêmur distal em perfil
Mostrando o levantamento periosteal em casca de
Cebola.

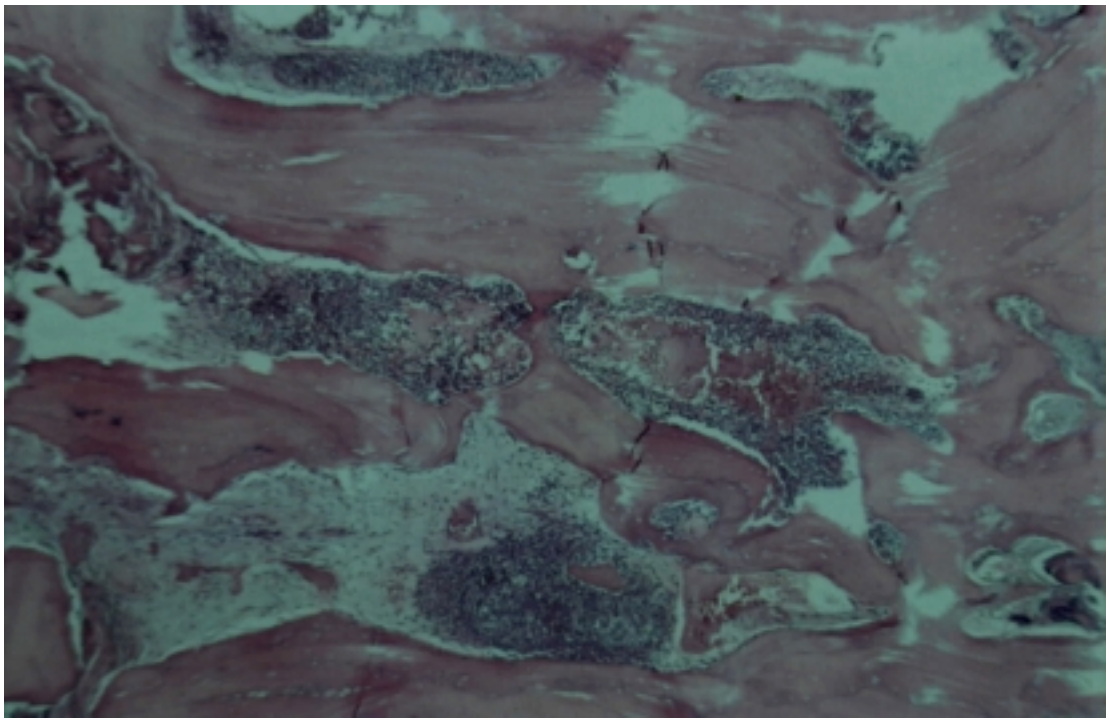


Fig 2 Caso 31 – (H&E original 10 x) corte histológico mostra a infiltração tumoral permeando a cortical óssea. Essa se espessa às custas de esclerose óssea reacional. O tecido tumoral intercalado por esclerose óssea cortical dá o aspecto radiográfico de "casca de cebola".

Fig.3 – caso 32 Radiografia simples do terço distal do femur
Mostra lesão lítica entremeadas com áreas de esclerose,
com aspecto permeativo e rotura da cortical.

Fig. 4 caso 29 Radiografia simples distal da tíbia
Mostrando o mesmo aspecto permeativo.
Achado comum nos SE/PNET

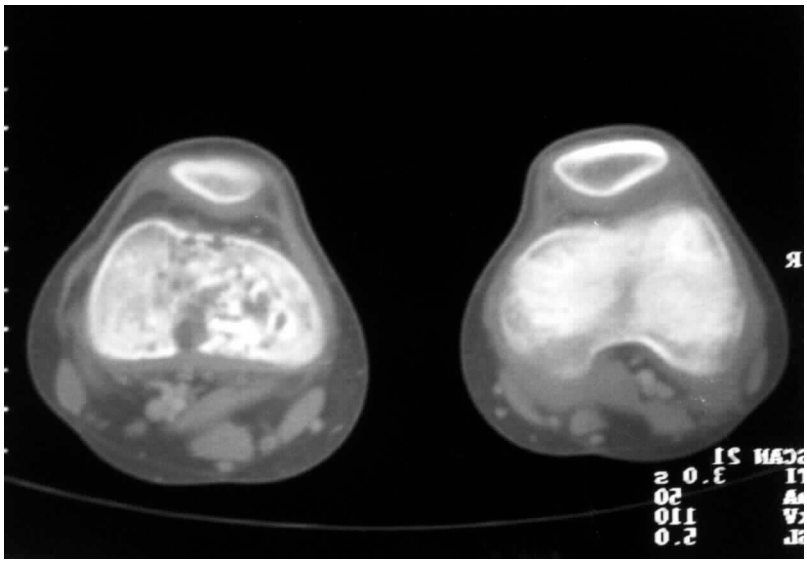


Fig. 5 Caso 31 Tomografia computadorizada mostrando um corte do fêmur distal com limites imprecisos do tumor

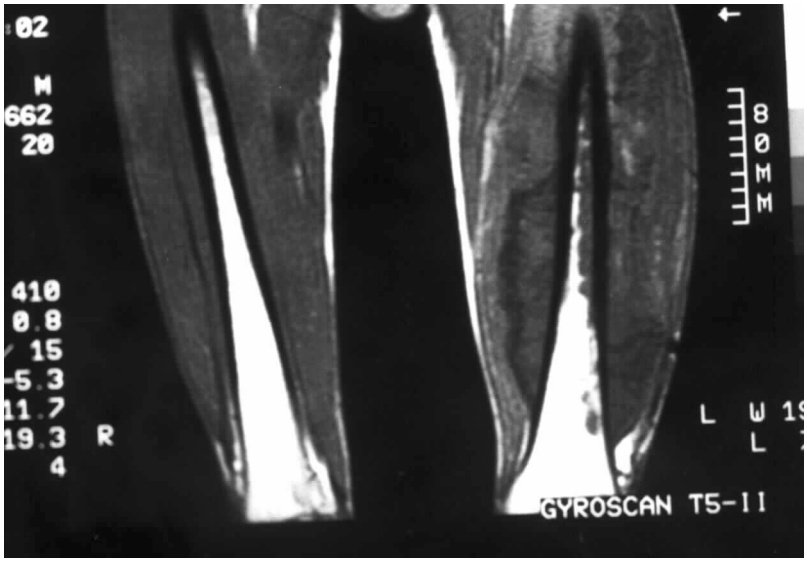


Fig. 6 Caso 31 Ressonância Nuclear Magnética para análise comparativa entre os femures. Observar à E, o comprometimento tumoral no canal medualr, e a extensão para partes moles de forma muito precisa.

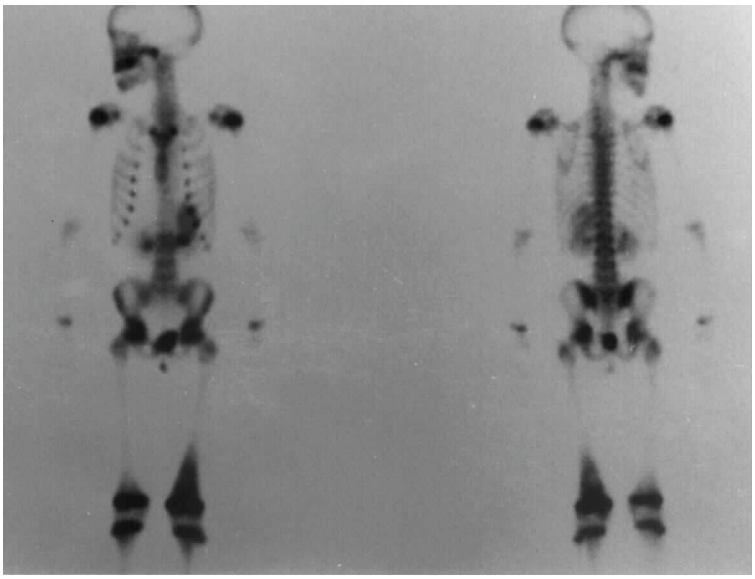


Fig. 7 . Caso 31 Cintilografia óssea $^{tc\ 99}$, demonstrando a hipercaptação do radiofármaco no 1/3 distal do fêmur E (seta), sem evidência de comprometimento em outro osso

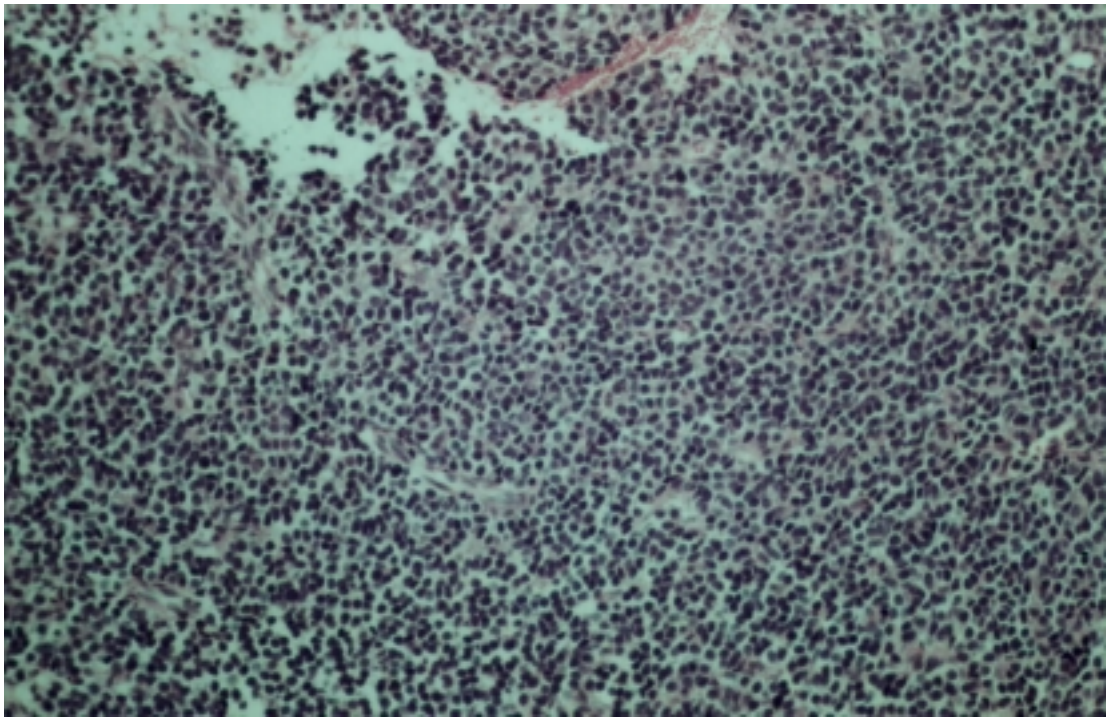


Fig. 8 Caso 29 (H&E original 10X) A figura mostra tecido neoplásico com padrão densamente celular monótono, septado por traves conjuntivas delicadas, com núcleos pequenos, escuros e citoplasma escasso.

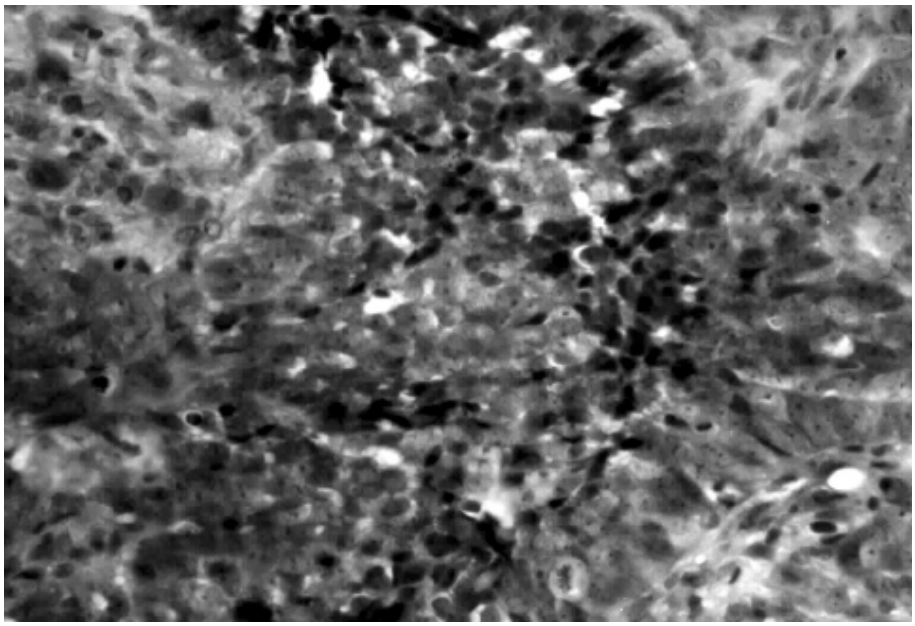
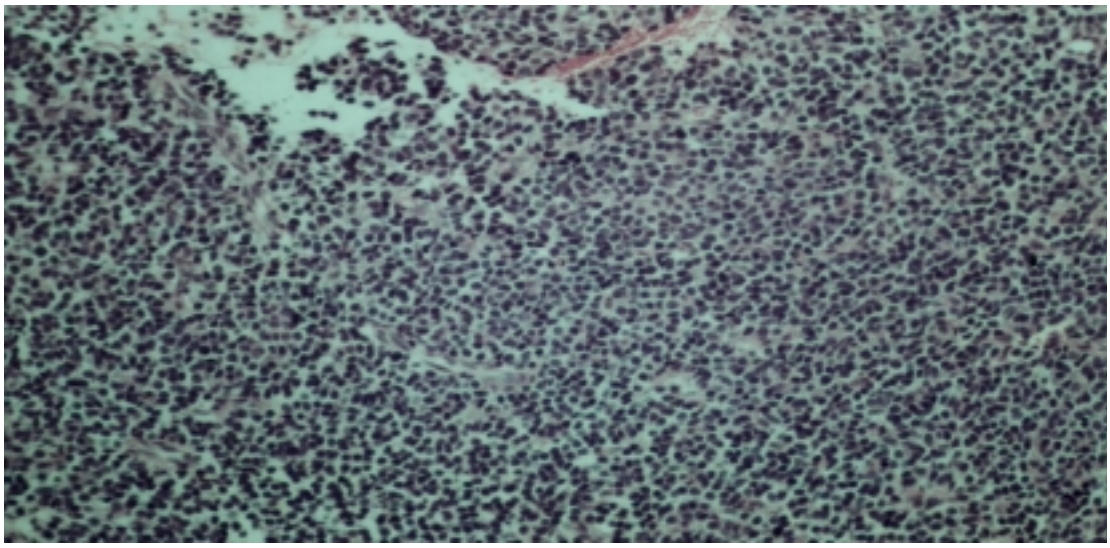


Fig.09. Caso 31 (H&E original 40x) A figura mostra padrão da apoptose nas células tumorais (seta vazia). Ver contraste com as células preservadas ou células principais (seta cheia).



Fi 10 A (H&E original 20x) mostra o SE clássico, células pequenas uniformes, com citoplasma escasso, núcleos pequenos com cromatina delicada e nucléolos pouco evidentes.

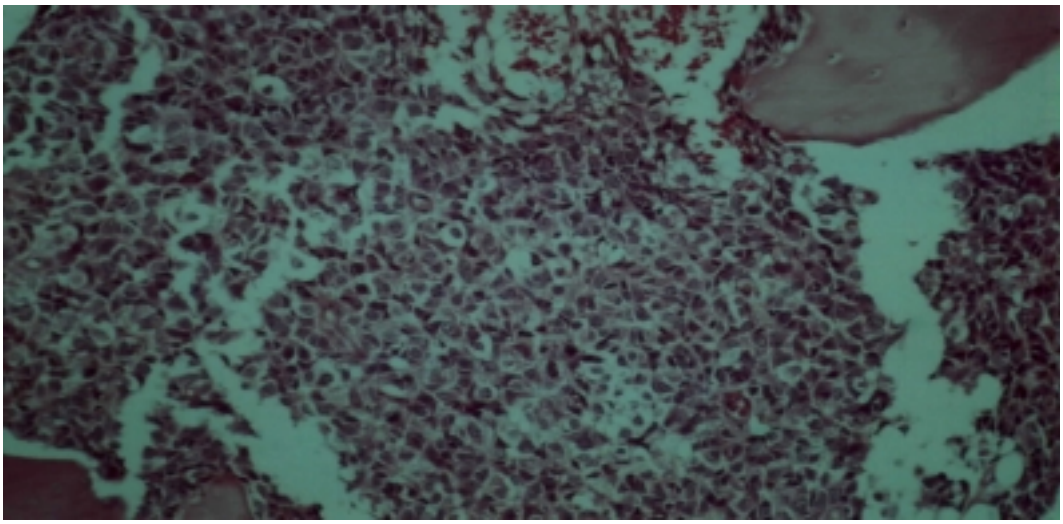


Fig.10B.Caso 03, (H&E original 20x), mostrando atipia celular, com núcleos maiores e irregulares, nucléolos evidentes (comparar com a figura A).

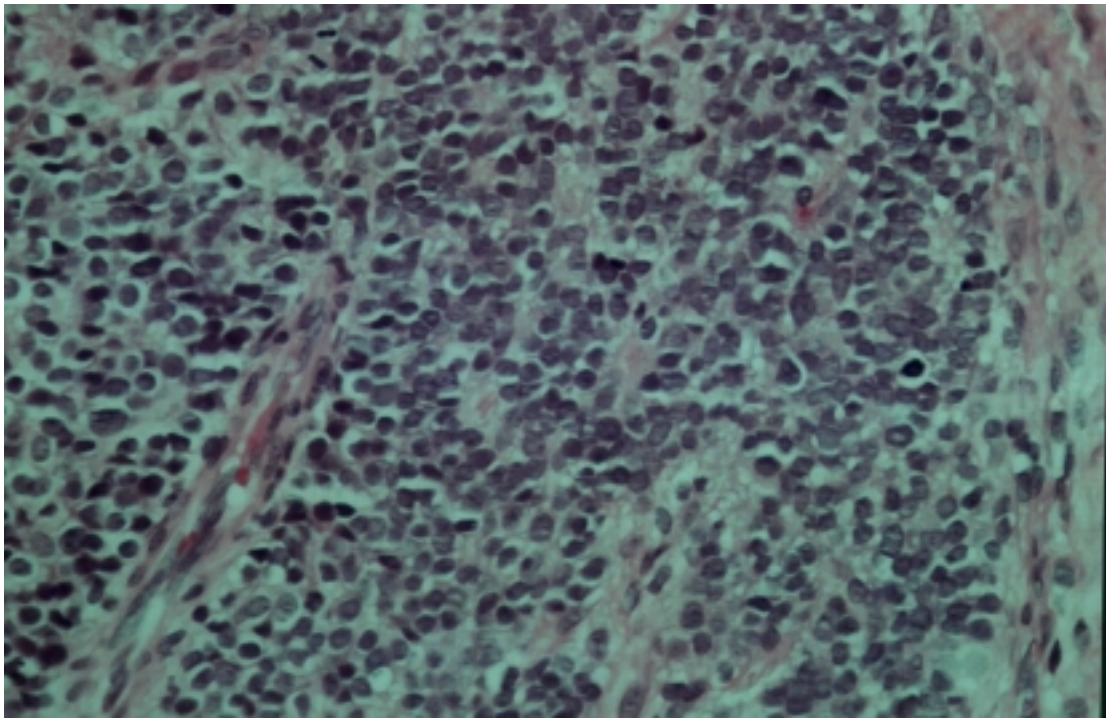


Fig.11 Caso 18 (H&E original 40x) A figura mostra a formação de rosetas verdadeiras de Homer Wright (seta).

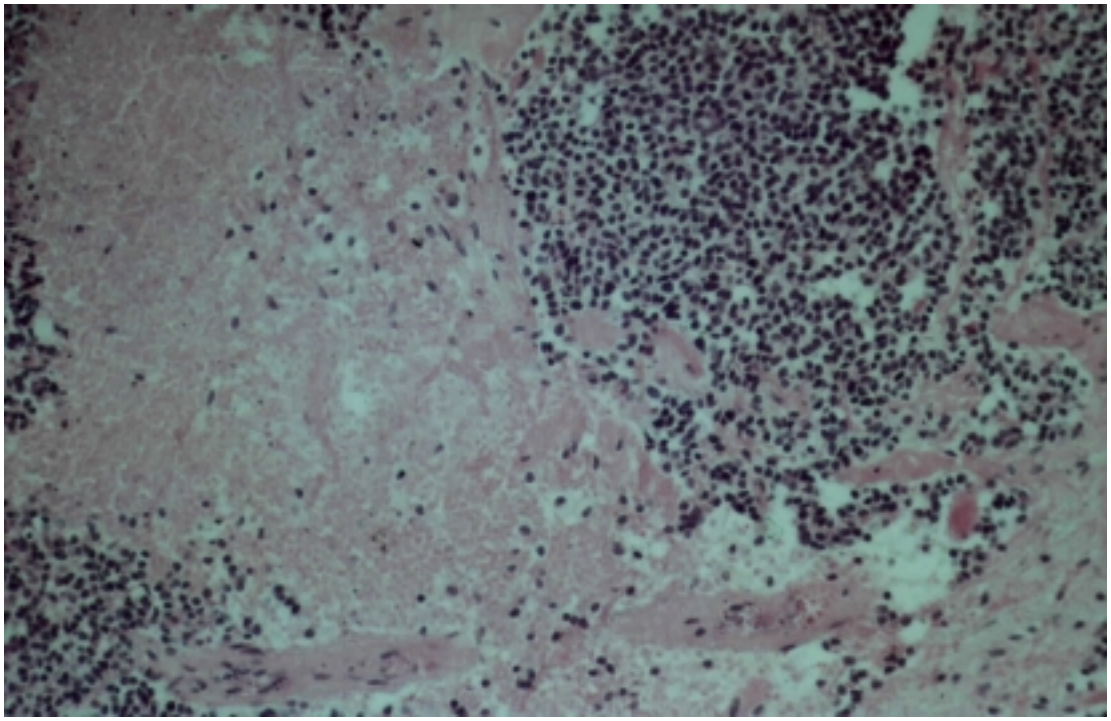


Fig.12 Caso 15 (H&E original 20x) A figura mostra área de necrose entremeada por células tumorais viáveis.

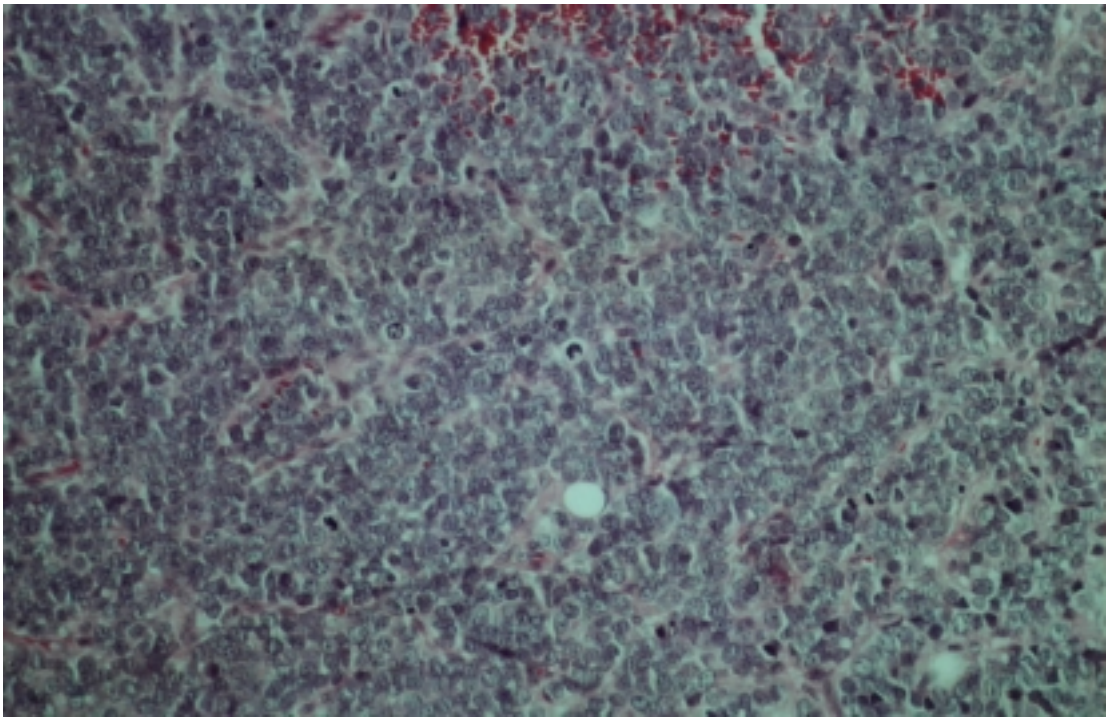


Fig.13. Caso 15 (H&E original 40x) A figura mostra muitas figuras de mitose por campo de maior aumento.

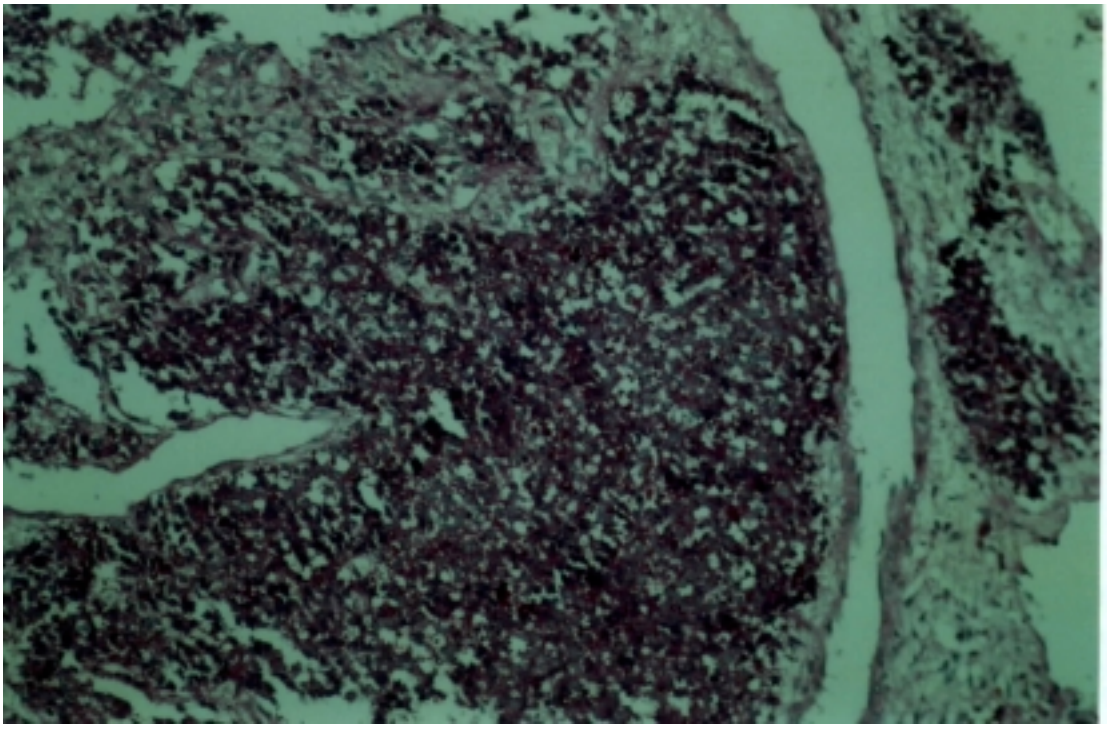


Fig. 14 Caso 02 (reação pelo PAS; original 20x) A figura mostra células coradas de vinho, correspondente ao material granular do glicogênio intracitoplasmático.

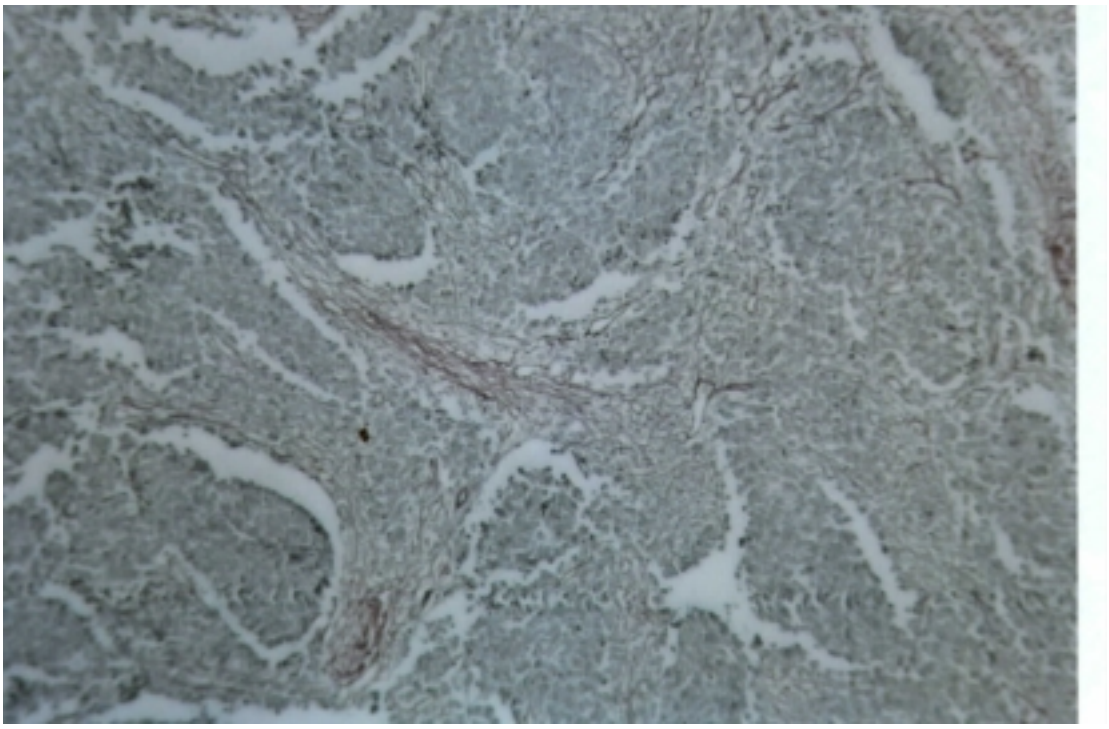


Fig.15. Caso 20 (coloração pela prata original 10 x) A figura mostra fibras de reticulina presentes envolvendo os lóbulos e não as células individualmente.

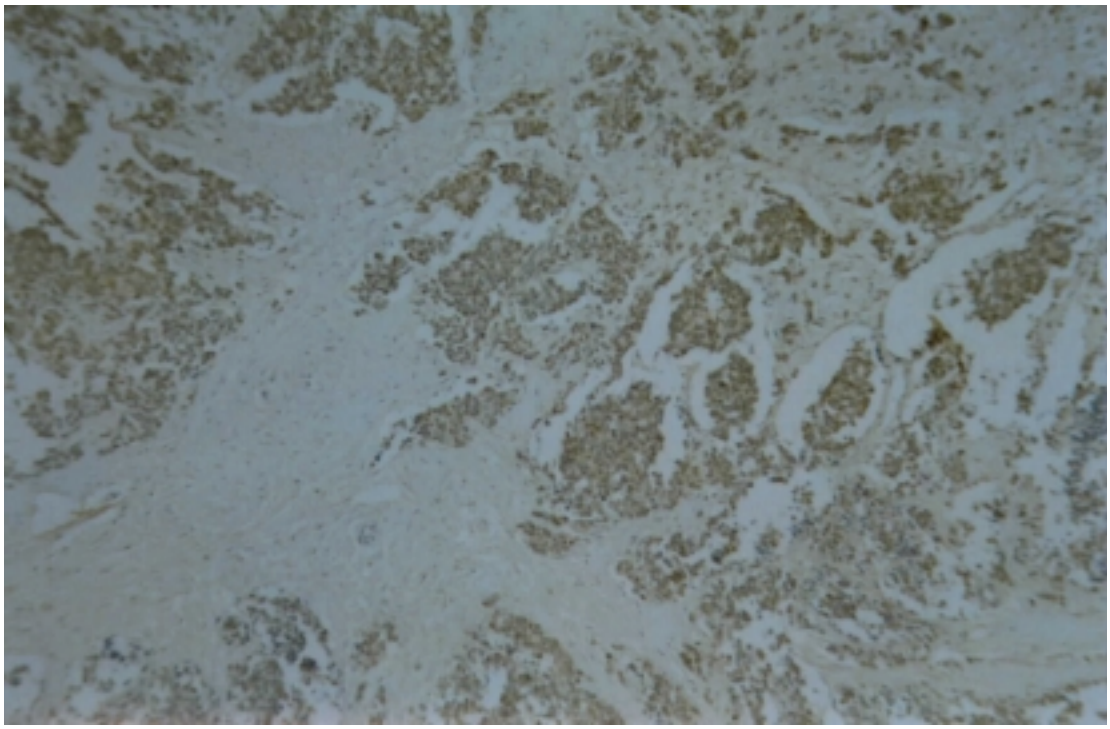


Fig. 16 caso 29 (original 40x),A figura mostra a reação positiva a NSE (células coradas em ferrugem expressam a positividade).

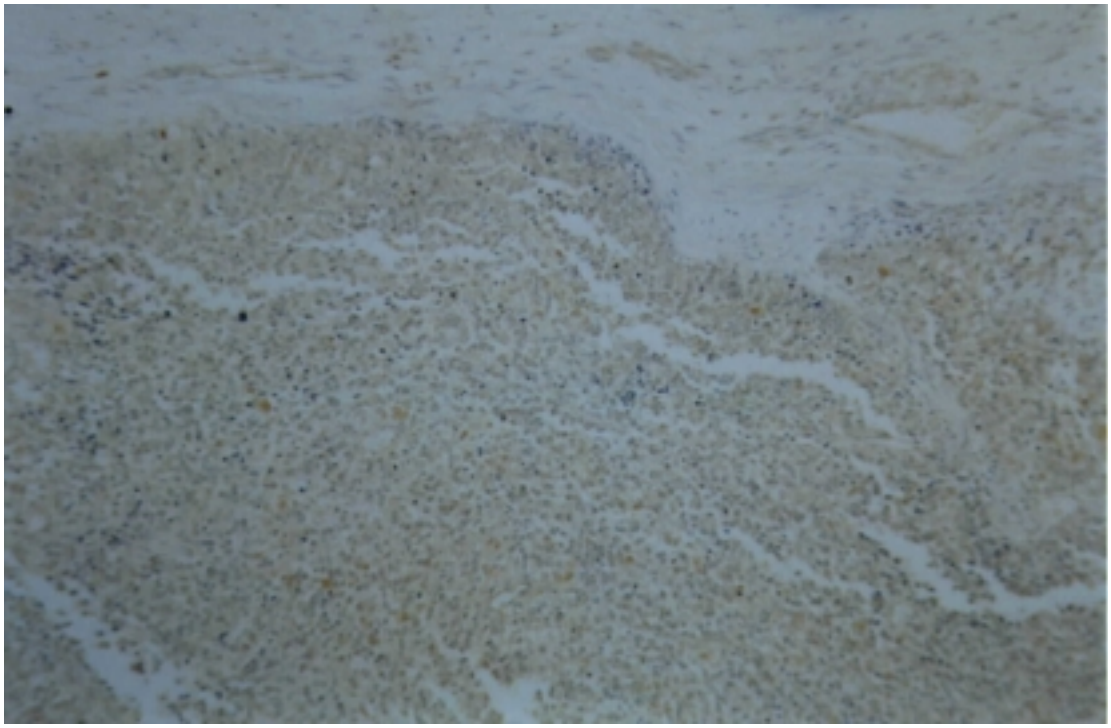


Fig. 17. Caso 03,(original 40x) A figura mostra a reação positiva ao S-100. Auto controle filete nervoso (seta).

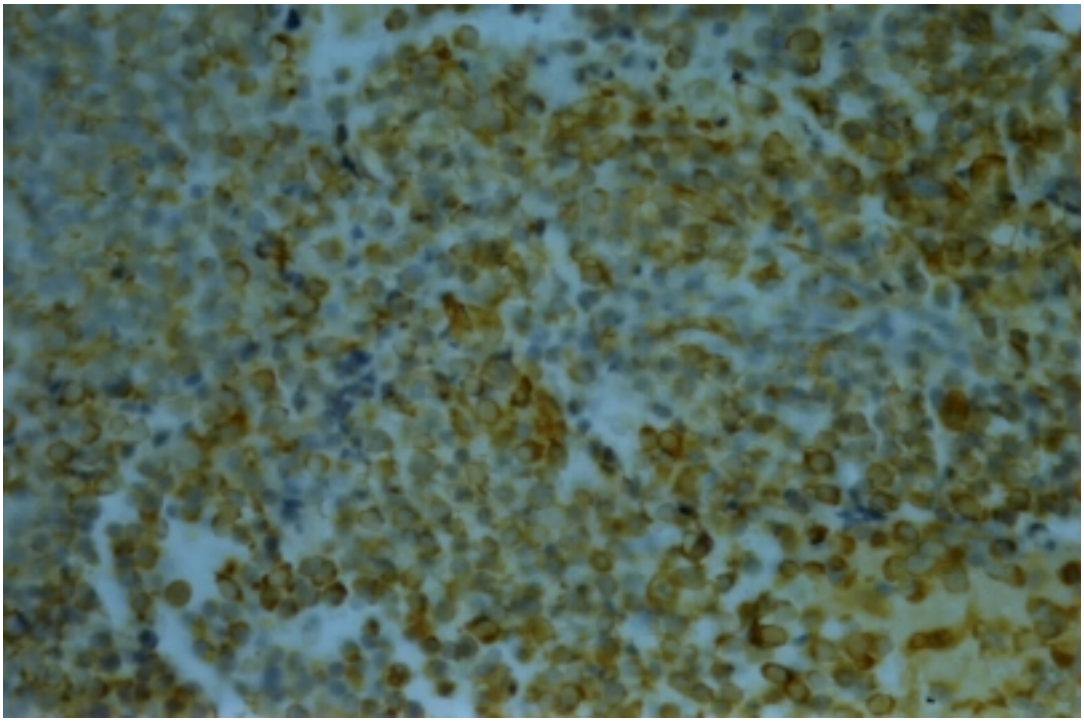


Fig.18 Caso 01,(original 20x) A figura mostra a reação positiva a Vimentina.

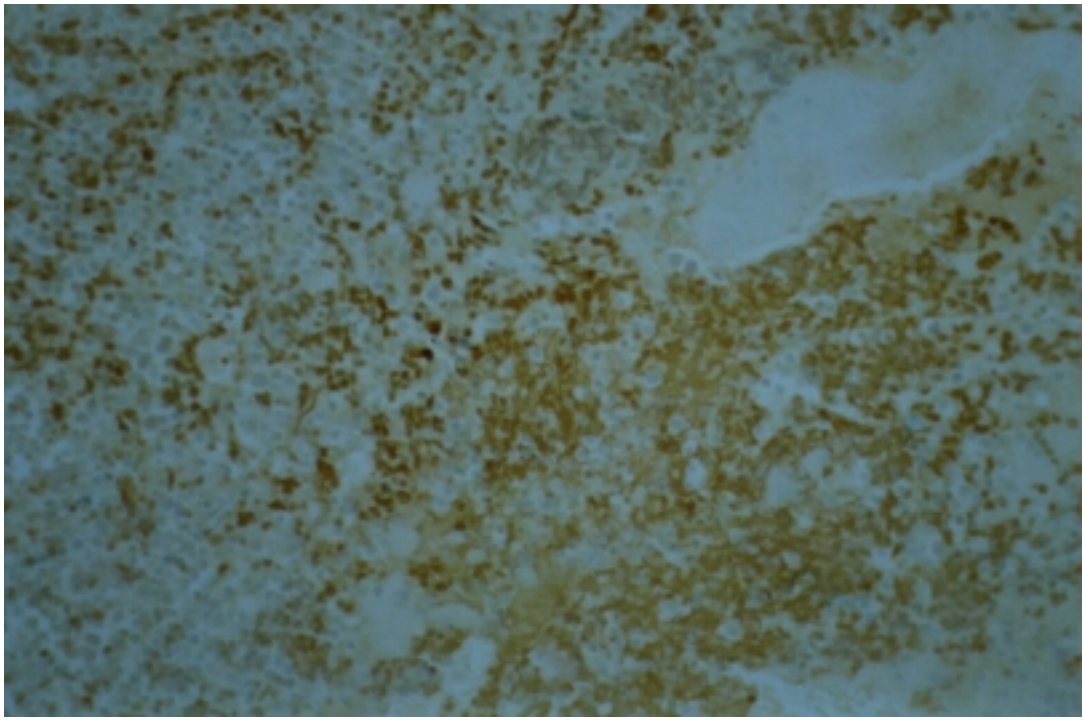


Fig. 19. (original 10x),A figura mostra reação positiva ao Leu-7.

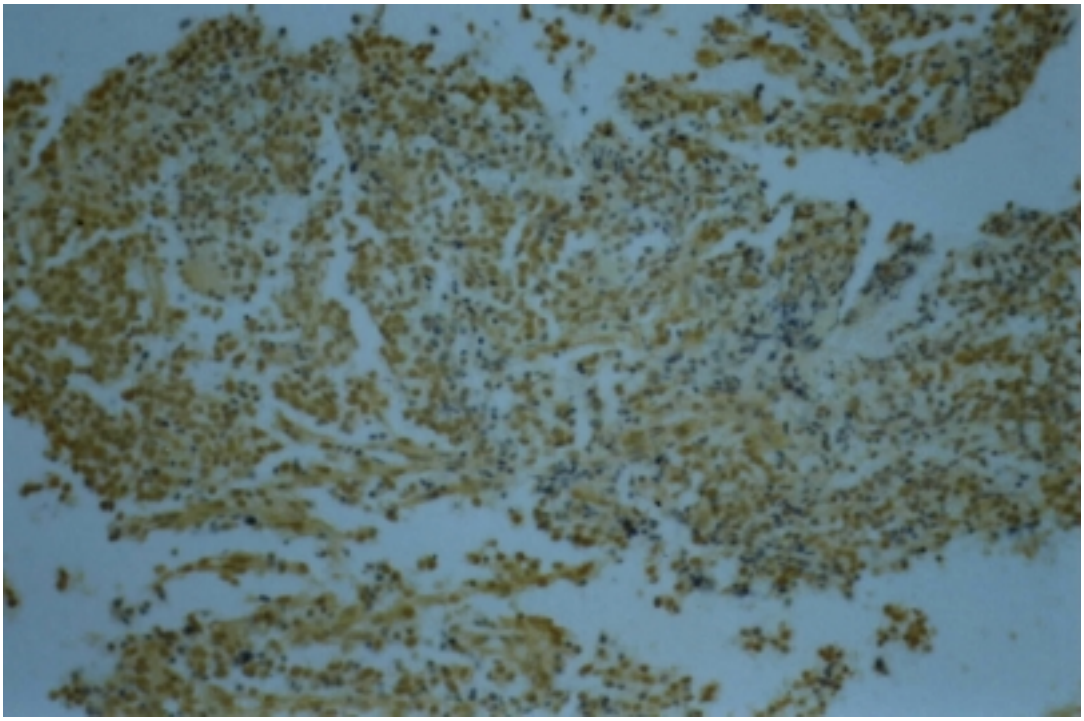


Fig 20 Caso 26 (original 10x) A figura mostra reação positiva a Cromogranina.

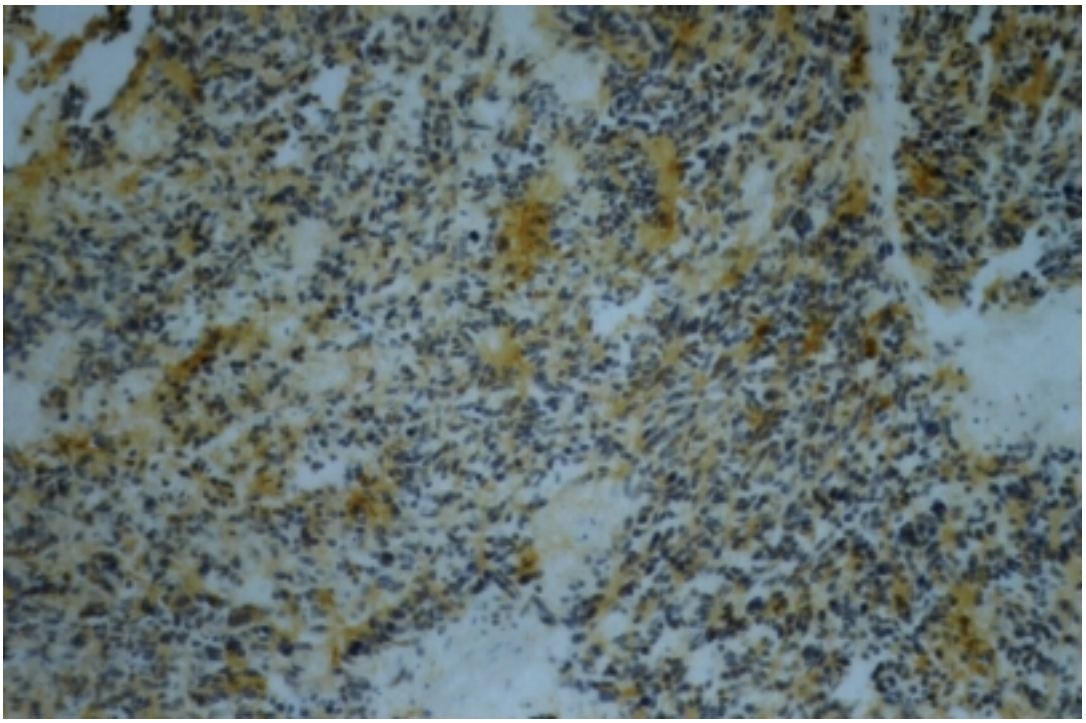


Fig. 21 Caso 21 (original 20x) A figura mostra reação positiva à Synaptofisina. Também evidenciamos nesta lâmina a formação de rosetas de Homer Wright (seta).

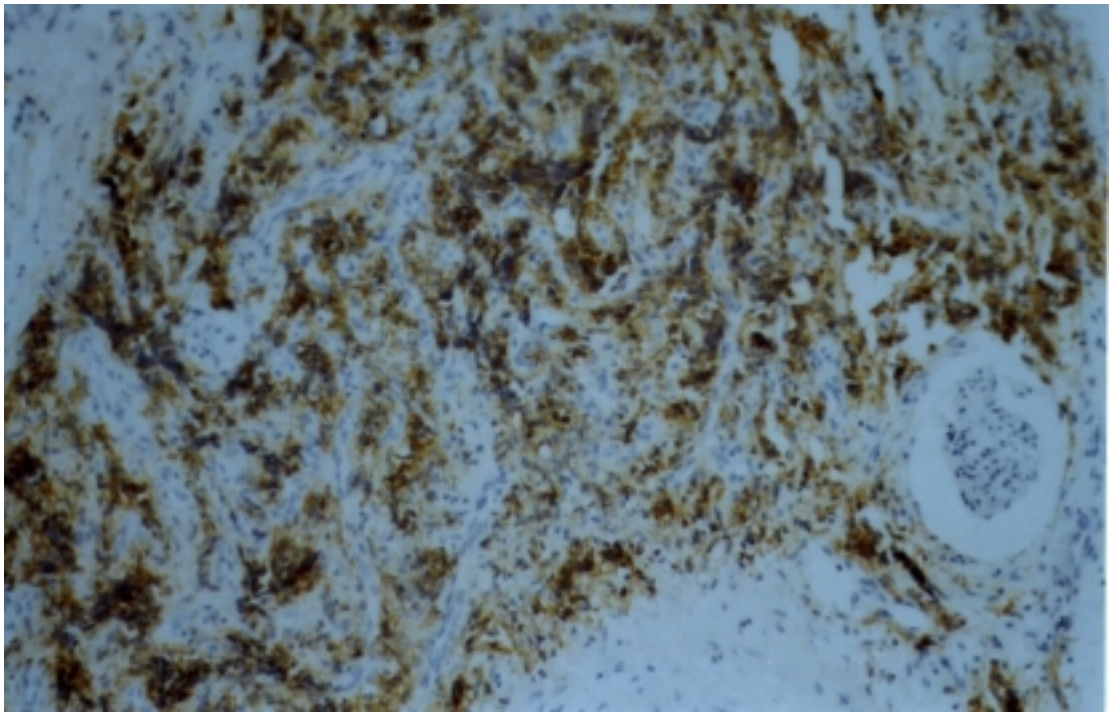


Fig. 22 Caso 31 (original 40x) A figura mostra a reação positiva ao CD99 evidenciando a presença do mic-2. Padrão de coloração que evidencia a membrana celular (glicoproteína de membrana).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Ushigome et al 1989, propõe serem o Sarcoma de Ewing e PNET, tumores participantes de uma mesma origem, na qual apenas representam estágios diferentes de uma mesma doença, onde numa avaliação espectral, num extremo estaria o Sarcoma de Ewing representado por células totalmente indiferenciadas e no extremo oposto estaria PNET mostrando diferenciação celular neural.

Clinicamente eles se apresentam da mesma forma, com queda do estado geral, febre, dor e aumento da temperatura local, aumento de volume local por massa em tecidos moles, alterações do hemograma que muitas vezes torna difícil o diagnóstico diferencial com a osteomielite (HOROWITZ et al 1991; SHAJOWICZ, 1993).

A idade em que o tumor se apresenta está descrita na literatura como sendo o pico da incidência entre a primeira e segunda década (LLOMBART-BOSCH, 1988; SCHIMIDT et al, 1993; FELLINGER, 1992; FRASSICA et al, 1993; DORFMAN & CZERNIAK, 1998), na nossa casuística tivemos uma distribuição igual de 26 pacientes na primeira e segunda década e os restantes 6 acima da segunda década. Estatisticamente não foi significante com relação à sobrevida, embora alguns autores reportaram uma ligeira tendência do PNET ser mais freqüente a partir da segunda década, e mais agressivo dada as suas próprias características próprias da diferenciação neural (USHIGOME et al, 1992; ROMANI et al, 1993; FRASSICA et al, 1993). A distribuição relativa ao sexo, originalmente descrita como mais

freqüente no sexo masculino (1,5 Homens para 1 Mulher). Na revisão da literatura sofre algumas modificações, quando se estuda separadamente o Sarcoma de Ewing ou o PNET. Romani et al, 1992 relata a distribuição relativa ao sexo de 7H:8M, quando estudaram apenas os casos de PNET. No nosso estudo tivemos uma distribuição igual entre os sexos, que também não foi de valor prognóstico. É um tumor raramente encontrado na raça negra, portanto de uma etnia quase exclusivamente caucasóide. Este achado se constatou nesse estudo, onde todos os pacientes eram brancos.

Em nossa série, a localização topográfica do tumor foi mais freqüente no esqueleto apendicular, onde o fêmur foi o osso mais acometido, também sugerida por Daugaard et al, 1989; Schmidt et al, 1991. Os autores que nos seus estudos compararam a distribuição topográfica do PNET especificamente, descreveram uma incidência muito maior no esqueleto axial (USHIGOME et al, 1992; SHIMIDT et al, 1992; ROMANI et al, 1993). Em conformidade com a literatura, estatisticamente existiu uma tendência a piora da sobrevida em pacientes que tinham localização no esqueleto axial.

A localização na pélvis desse tumor compromete muito a sobrevida (FRASSICA et al, 1993). Em nossa casuística observamos apenas uma tendência a esse fato, além do que, o número estudado foi muito pequeno (3). Assim sendo não temos parâmetros estatísticos confiáveis para afirmar. Uma das explicações para esse

mau prognóstico é que se o tumor cresce para o interior da pélvis, muitas vezes de forma silenciosa sem sintomatologia que o identifique precocemente, e no momento do diagnóstico já é muito extenso com o envolvimento de órgãos pélvicos. Uma outra possibilidade é a dificuldade de remoção cirúrgica adequada, dada a proximidade do tumor com estruturas vitais intrapélvicas, fato esse que dificilmente ocorre com os tumores localizados no esqueleto apendicular.

O estadiamento para os tumores musculoesqueléticos de Enneking, é utilizado na maioria dos serviços de oncologia ao redor do mundo, com a finalidade estabelecer um padrão de avaliação e estadiamento com conseqüente uniformidade de tratamento para os pacientes. Quanto maior a graduação, piora a sobrevida, uma vez que essa graduação está relacionada com o crescimento tumoral intra ou extracompartimental, ao grau histológico, e presença de metástases (ENNEKING et al, 1983; FRASSICA et al, 1993). Em nossa casuística, os pacientes com o grau IIIB, tiveram uma tendência ao comprometimento da sobrevida.

A presença de metástase ao diagnóstico é relatada na literatura como um fator de mau prognóstico (PATRÍCIO et al, 1992, FLECHNER et al,1993), independente do número de lesões (PAULISSEN et al, 1998). Em nossa casuística cerca de 18% (6/32) dos nossos pacientes tinham metástase presente ao diagnóstico, o que está em conforme com os achados de PAULISSEN et al (1998). A metástase não apresentou significância estatística, como um fator isolado de mau prognóstico, mas foi de significância relevante quando associada com o índice de diferenciação neural.

O paciente que não apresenta metástase ao diagnóstico e a desenvolve no decorrer da quimioterapia, representa uma falha de tratamento, e está relacionada com tumores que apresentam padrão de atipia celular ao exame histopatológico (BURGET et al, 1990, CANGIR et al, 1990, HARTMAN et al,1991). Na nossa série, não houve significância na correlação da presença de metástase e atipia celular. A sobrevida média de nossos pacientes está em aproximadamente 20 meses, de conformidade com a literatura, que mostra sobrevida em torno de 25 meses (LLOMBART-BOSCH et al, 1989; MUNOZ et al 1998),18 meses (HEIJ et al, 1994) e 12 meses em pacientes com tumores pélvicos (FRASSICA et al, 1993).

Na avaliação dos exames de imagem, todos os tumores mostraram um padrão semelhante em todos os casos, caracterizado por acometimento metafisário, com áreas de lise óssea, entremeados por esclerose óssea com ruptura da cortical e extensão do tumor para partes moles. O volume tumoral não foi avaliado, pois muito pacientes não tinham tomografia que permitisse uma avaliação segura. Existe controvérsia na literatura com relação a real significância do volume do tumor e prognóstico. Para os achados de Picci et al (1993), o volume tumoral ao diagnóstico não teve importância prognóstica. Segundo evidências de Patricio et al (1991), os pacientes com maior volume tumoral ao diagnóstico tiveram pior prognóstico assim como o tempo de sobrevida livre de doença nesses casos foi bem maior nos pacientes com tumor de menor volume. O autor infelizmente, não menciona a dimensão real das lesões. Embora não tenhamos medido o volume tumoral, achamos que esse ponto

na literatura deixa margens para muita discussão, pois sistematicamente essa neoplasia quando diagnosticada já tem um comprometimento grande de partes moles, e portanto um grande volume.

Na literatura disponível, existem controvérsias a respeito da atipia celular correlacionada com a sobrevida. Vários autores (LLOMBART-BOSCH 1986 - 1989, SCHIMIDT et al, 1991; ODA et al, 1995), não encontraram relação significativa entre a atipia e prognóstico. No entanto para alguns autores (HARTMAN et al, 1991; USHIGOME et al,1992; ROMANI et al, 1993), quando o tumor apresenta aspecto lobular, células de volume aumentado tem sido correlacionada com o mau prognóstico, desde que as células tumorais, mostram diferenciação neural. A atipia celular ao nosso ver, não pode ter significado relevante isoladamente, porquê o material de biópsia pode estar representado um pequeno universo de todo o tumor, e nesse espécime pode ter um predomínio de células morfologicamente típicas, e com conseqüente melhor prognóstico. Na avaliação global, quando se discute na literatura os achados hitopatológicos, tem se valorizado o aspecto em jogo de xadrez, dada pelas células neoplásicas preservadas (tipo 1) e em apopitose (tipo 2) (KISSANE et al, 1983; LLOMBART-BOSCH et al, 1986; HARTMANN et al, 1991).

Nos nossos achados a atipia celular tumoral não teve influência na redução da sobrevida.

O achado de rosetas de Homer-Wright, tem sido considerado por vários autores como um critério morfológico de diferenciação neural do Sarcoma de Ewing,

e conseqüentemente de mau prognóstico (LLOMBART-BOSCH et al,1986; SCHIMIDT et al, 1991; USHIGOME et al, 1992; ROMANI et al, 1993; NAVARRO et al, 1994; ODA et al, 1995). Em nossa série, encontramos essas rosetas em 7 pacientes as quais se correlacionaram com extremo significância com o mau prognóstico (sobrevida média em torno de 18 meses).

A presença de rosetas foi o único dado histopatológico que teve correlação direta com a sobrevida em nossa série, e foi considerado por nós como um importante fator de diferenciação neural.

A avaliação da necrose tumoral espontânea presente no diagnóstico histopatológico tem sido um fator de controvérsia. Alguns autores demonstraram correlação direta e progressiva do comprometimento prognóstico a medida do aumento do grau de necrose (LLOMBART-BOSCH et al, 1986; DAUGAARD et al, 1989; FLECHNER & MILLS, 1993). Pacientes com necrose tumoral espontânea acima de 50% apresentaram sobrevida em torno de 11 meses (DAUGAARD 1989) com piora à medida da associação com o comprometimento extenso de partes moles (LLOMBAT-BOSCH et al,1986). Em nossa série, não tivemos uma correlação importante entre a necrose e o óbito dos pacientes analisados. Vale a pena esclarecer um ponto, a qualidade e quantidade do material colhido tem muita influência em uma avaliação histopatológica quanto à quantificação da necrose ao diagnóstico. Esta pode variar de acordo com o local da retirada da biópsia. Na hipótese dela ser retirada de uma área mais central do tumor, muito provavelmente a chance de se obter área

necrótica será maior do que se a retirada de área mais periférica e com melhor aporte vascular. Em nossos pacientes as biópsias foram obtidas tomando-se o cuidado da retirada do material obter um espectro de todo o tumor.

Segundo Shajowicz (1994), as mitoses estão presentes mas são infreqüentes, o que contrasta com um crescimento rápido " a olhos vistos " nesta neoplasia. Neste trabalho observou-se que o índice mitótico variou de 0 a 22 mitoses por 10 campos de maior aumento (C.M.A.).

O que observamos em nossos casos, foi a presença constante de mitoses, sendo que em 26 casos o índice mitótico estava abaixo de 1 C.M.A. Não obtivemos correlação desse índice com a sobrevida, já Daugaard et al (1989), avaliando 87 pacientes, observou correlação na contagem de mitoses, quando era menor do que 1 C.M.A. a sobrevida média era de 26 meses e quando maior ou igual a 1 C.M.A. a sobrevida reduzia drasticamente para 12 meses.

A presença de glicogênio intracitoplasmático, descrita na década passada por Shajowicz, como achado importante para o diagnóstico do Sarcoma de Ewing/PNET, é ainda hoje utilizada para separar os tumores de células redondas. Cerca de 80% a 90% dos Sarcomas de Ewing apresentam grânulos PAS positivos (LLOMBART-BOSCH et al,1989; ROSENBERG et al, 1990; HARTMAN et al, 1991; SCHIMIDT et al, 1991; ROESSNER et al,1993; PICCI et al, 1993). Em nossa série, tivemos cerca de 60% de positividade quanto à presença de glicogênio intracitoplamático, sem no entanto ter qualquer correlação com o mau prognóstico. Também Daugaard et al

(1989) não obtiveram qualquer relação desse achado com a sobrevida. A medida em que a célula do SE tem diferenciação neural, ela deixa de apresentar glicogênio no citoplasma. Embora cerca de 10% dos PNETs apresentam glicogênio, era de se esperar que a ausência do PAS fosse prognosticamente ruim, e no entanto não o é.

O estudo das fibras de reticulina mostrou padrão de envolvimento restrito às traves fibroconjuntivas e de permeio do tumor e não envolvendo células neoplásicas, em acordo com várias descrições e livros textos. Esta coloração ajuda muito nos tumores de células redondas, para separar o linfoma, do Sarcoma de Ewing.

Segundo Ambros et al (1991) o processo de descalcificação que é submetido o material da biópsia óssea, pode alterar e muito a resposta imunogênica celular, sendo que os resultados quando negativos deverão ser interpretados com muita cautela.

O uso da reação imuno-histoquímica para o diagnóstico e o prognóstico do Sarcoma de Ewing, começou a ser mais utilizada a partir de 1984 (TSOKOS et al, 1984).

O gem Bcl-2, foi originalmente descrito como um gem envolvido da translocação cromossômica do linfoma tipo B. Nos dias de hoje sabemos que esse gem está ligado ao controle da morte celular. A identificação do Bcl-2 é muito importante, pois mostra a correlação entre morte celular e resistência a quimio e radioterapia (DORFMAN & CZERNIAC 1998).

Na nossa casuística, somente 2 pacientes mostraram imunogenicidade presente para esse marcador, e coincidentemente os dois foram a óbito com 13 e 16 meses de seguimento. Não houve fator prognóstico com esses casos, mas acreditamos que isso se deva ao número reduzido de pacientes.

O antígeno leucocitário comum, do ponto de vista prático, é um marcador altamente específico para leucócitos, usado para diagnóstico dos linfomas em geral, e portanto deve fazer parte do painel imuno-histoquímico para o diagnóstico diferencial entre as neoplasias de células redondas. Deve ter cautela na sua avaliação, devido a presença de elementos inflamatórios nos tumores (SEIXAS, MT 1995). Na análise dos nossos casos esse marcador foi negativo.

A citoqueratina é utilizada para identificar um grupo de polipepitídeos com peso molecular variando de 40 a 67 KDa, e para diagnosticar neoplasias provenientes dos tecidos de origem epitelial (DORFMAN & CZERNIAK, 1998), porém não é específica podendo aparecer em neoplasias de origem mesenquimatosa. A identificação da citoqueratina (Cam 5.2) nos Sarcoma de Ewing/PNET, tem sido demonstrada por vários autores (COLLINI et al, 1998;) Alguns trabalhos têm evidenciado correlação entre este marcador e melhora da sobrevida (SCHMIDT et al, 1991). Em nossa casuística, tivemos positividade em apenas 3 pacientes, 9,37%, identificamos uma tendência a piora da sobrevida. Talvez com uma quantidade maior de pacientes poderíamos chegar a uma outra conclusão.

A reação da Vimentina, expressa universalmente positividade para células provenientes do mesênquima e algumas epiteliais e suas neoplasias. A sua presença, de uma certa forma, garante que a imunogenicidade da célula está preservada. (DORFMAN & CZERNIAC 1998). Alguns autores relatam a sua presença como um auxiliar no diagnóstico do SE mas sem muito valor prognóstico (FELLINGER et al, 1992). Nós obtivemos uma positividade para a Vimentina em nossa série de 75% (24/32), sem significância prognostica.

O gem MIC2, localizado no braço curto do cromossomo X, produz uma glicoproteína cuja função se acredita estar relacionada com a adesividade celular, e pode estar envolvido na formação da estrutura das rosetas (DORFMAN & CZERNIAC, 1998). Essa glicoproteína expressada pelo antígeno CD99, é detectada pelos anticorpos monoclonais HBA71, 013, 12E7 e MIC-2 (RAMANI et al 1993, FLEXNER & MILLS 1993, FELLINGER et al 1992). O Sarcoma de Ewing/PNET expressa positividade para o CD99 em pelo menos 90% a 95%, mas não é específico para eles, uma vez que pode expressar positividade para outros tumores pediátricos, como linfoma linfocítico, e ocasionalmente rabdomiossarcoma e sarcoma sinovial (DORFMAN & CZERNIAK, 1998; FELLINGER et al, 1992), e em tecidos não neoplásicos, como músculo esquelético, medula óssea, e linfócitos do baço e linfonodos (MACMANUS et al 1996).

Segundo Fellinger et al (1992), esse reagente pode ser aplicado a todos os tecidos acondicionados em parafina e descalcificados, sem perda da antigenicidade da

célula. Ambros et al 1986, Ushigome et al 1992, publicaram artigos onde sugeriam que nos tecidos descalcificados existe possibilidade real de perda dessa imunogenicidade, e recomendam o uso de material congelado para o estudo imuno-histoquímico do CD99. Em nossa série tivemos positividade de 71,87%. Essa incidência parece relevante, uma vez que só utilizamos material emblocado em parafina.

Embora esses achados sejam abaixo do que se costuma encontrar na literatura, observamos que dos 32 casos avaliados, somente em 2 casos ambos: CD99 e Vim foram negativos. Nos demais a freqüência do CD99 e Vim exibiram respectivamente 71,87% e 75%. Segundo Fellinger et al (1991), a presença desses dois marcadores, associado à clínica, histopatologia, já seriam suficientes para dar o diagnóstico de Sarcoma de Ewing. A função do CD99 na realidade, é mais para confirmação diagnostica do SE/PNET do que um fator prognóstico.

Após a confirmação diagnóstica do SE/PNET, usamos os marcadores neurais para fazer a distinção entre os SE com, e sem diferenciação neural (PNET), a qual já relatamos tem influência no mau prognóstico.

Um dos principais marcadores neurais, utilizado amplamente na literatura, é o NSE. É uma enzima glicolítica que transforma piruvato de 2-fosfoglicerato em piruvato de fosfofenol. Essa proteína tem subunidades que são específicas para vários tecidos, explicando sua presença por exemplo, para células musculoesqueléticas, outra subunidade presente nas células gliais, outro no cérebro e tecido

neuroendócrino (DORFMAN & CZERNIAK 1998). Em trabalhos de Fellinger et al em 1992, o NSE não se mostrou importante como fator prognóstico isolado. Foi usado em nossa série como um marcador neural, e tivemos uma positividade de 34,37% dos casos. Na correlação com o prognóstico foi notório o seu significância. A sobrevida média dos pacientes estava em torno de 11 meses.

A proteína S-100, foi originalmente identificada nas células gliais, e células de Schwann, mas pode se expressar em melanóciotos, células de gordura, células mioepiletilais e células de Langherans, células cartilaginosas e nos cordomas (DORFMAN & CZERNIAC, 1998). È usada como um marcador neural. Curiosamente, a sua expressão, segundo trabalho de Schimdt et al (1991), mostra que este marcador pode estar relacionado com um curso clínico favorável. Em nossa casuística, a expressividade pelo S-100 ocorreu em 25% dos casos e não mostrou qualquer valor prognóstico.

O Leu-7, é identificado como marcador em bainha do nervo e células neuroendócrinas, usado para fazer diagnóstico diferencial entre neoplasias de células fusiformes e tumor de origem em bainha nervosa. Segundo Schmidt et al (1991), a presença do Leu-7, associada a outros marcadores de diferenciação neural ou mesmo isolado em sarcoma tipo PNET indica um prognóstico pior. O leu-7 foi encontrado em 3 pacientes desta casuística e não mostrou qualquer valor prognóstico.

A utilização do neurofilamento, como marcador neural, tem sido recomendado para diagnosticar tumores neurogênicos. Ele é subdividido em três

distintos polipepitídeos com diferentes pesos moleculares, com positividade para SE/PNET e neuroblastoma (USHIGOME et al, 1989). Não fala a freqüência em que esse marcador foi identificado, mas em nossa casuística encontramos em apenas um paciente não sendo possível qualquer correlação prognostica.

A Sinaptofisina é um marcador identificado nas células neurais e nas vesículas pré-sinápticas. Tem sido usada como um marcador neural em tumores com diferenciação neuroendócrina, como por exemplo o neuroblastoma, paraganglioma e outros (DORFMAN & CZERNIAK, 1998). A expressão da positividade desse marcador em nossos casos foi de 21,87% e não mostrou qualquer valor estatístico.

A proteína glial fibrilar (GFAP), identificada nas células gliais, é usada no diagnóstico diferencial dos tumores localizados no crânio, coluna vertebral e bainha dos nervos periféricos(DORFMAN & CZERNIAC, 1998). Esteve presente em apenas 12,50% dos casos sem relevância prognostica.

A Cromogranina foi identificada em 43% dos casos, e não mostrou valor prognóstico isoladamente.

Schmidt et al (1991), foram autores que mais avaliaram a relação entre marcadores neurais e prognóstico do SE. Eles chegaram a propor uma nova classificação dos SE/PNET segundo a sua diferenciação neural, indicada pela aquisição de marcadores neurais, na avaliação imuno-histoquímica de seus pacientes.

Eles classificam os tumores em 4 grupos dependendo da presença de marcadores neurais. **Grupo I** sem qualquer marcador incluindo a ausência de rosetas

de Homer-Wright, **Grupo II** quando o tumor apresenta um marcador neural e seriam considerados SE. Já os **Grupos III e IV** seriam os tumores que apresentam dois ou mais marcadores neurais, e/ou rosetas verdadeiras e considerados PNET. Notou que os pacientes dos grupos III e IV tinham sobrevida pior do que os grupos I e II.

Em nossa casuística fizemos essa distribuição e não encontramos correlação prognóstica, entre a avaliação isolada e em conjunto com os marcadores neurais, a exceção do NSE especificamente e rosetas de Homer-Wright. Eles foram os únicos marcadores que avaliados em conjunto ou isolados tiveram notória relação com o mau prognóstico nos nossos casos,($p< 0,05$). Usamos a aquisição desses marcadores, a medida em que eles iam aparecendo em nossos casos e elaboramos um índice, o qual chamamos de índice de diferenciação neural (I.D.N.). O **grau 0**, quando não apresentava nenhum desses marcadores, o **grau I** quando era identificado um marcador, podendo ser o NSE ou a presença de rosetas verdadeiras, e **grau II** quando estavam presentes esses dois marcadores.

Em nossos casos o IDN se mostrou altamente sensível e diretamente proporcional, isto é à medida que aumenta a sua graduação, observa relação direta com o comprometimento da sobrevida ($P= 0,0028$).

Teoricamente, a presença de metástase ao diagnóstico, tem sido um fator clínico que compromete a sobrevida. Além da metástase ao diagnóstico, outros fatores, tais como, necrose tumoral espontânea, e a localização no esqueleto axial da neoplasia, tem sido de relevância prognóstica na literatura. Para testar a estabilidade

do IDN, era necessário compará-lo com outros fatores de piora do prognóstico. Embora não tão significantes, e com o p acima de 0,05, comparamos esses fatores com o IDN, usando o método de BOOTSTRAP, que é um artifício estatístico que permite avaliar com segurança um número pequeno de pacientes. Fizemos 100 grupos de 32 casos sorteados aleatoriamente do grupo principal. Aplicamos a regressão de Cox e o IDN, se mostrou muito estável aparecendo em 94% dos grupos, seguido da localização axial do tumor, metástase e necrose tumoral espontânea.

Com esses dados, fizemos um índice global de sobrevida (IGS), associando aqueles fatores ao IDN. Claro que não tivemos o mesmo rigor estatístico usado no IDN, uma vez que na análise univariada o p para a necrose e metástase ao diagnóstico e localização no esqueleto axial ficou acima de 0,05. Mas os resultados que obtivemos, quando aplicamos o IGS em nossos casos nos permite sugerir que a utilização deste índice mostra-se promissora nos estudos dos sarcomas de Ewing e PNET.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Após as avaliações e comparações de todos os fatores disponíveis para análise com o prognóstico, chegamos as seguintes conclusões:

1 – A diferenciação neural caracterizada pela presença de rosetas de Homer-Wright e positividade ao N.S.E., demonstraram estreita correlação com redução de sobrevida, tornando fundamental a sua pesquisa nas avaliações histopatológicas do sarcoma de Ewing/PNET.

2 – O Índice de Diferenciação Neural (IDN), foi definitivo em mostrar a piora do prognóstico à medida do aumento da sua graduação.

3 – A correlação prognóstica observada na aplicação do Índice Global de Sobrevida (IGS), que agrupa: metástase presente ao diagnóstico, necrose tumoral espontânea e a localização topográfica no esqueleto axial, mostra-se promissora nos estudos dos sarcomas de Ewing/PNET.

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

AMBROS M, AMBROS P, STREHL S, et al. Mic-2 is a Specific Marker for Ewing Sarcoma and Periferal Primitive Neuroectodermal Tumors from Mic-2 expression and specific chromossome aberration. *Cancer* - **vol 67**: 1886-1893, 1991.

CAVAZZANA A O, MISER JS, JEFFERSON J et al. Experimental Evidence for a Neural Origem of Ewing's Sarcoma of Bone. *American Journal of Pathology* ,**vol 127**, **N° 3**: 507- 518, 1987.

CAMPANACCI M, RUGGIERI P. Sarcome d'Ewing - *Encycl. Méd. Chir. Apparell Locomoteur, 14-030-D-40, Cancerologie,* **vol 60-14-030-A10:** 1993, 8p.

CANGIR A, VIETTI T, GEHAN E, et al. Ewing's Sarcoma Metastatic at Diagnosis - Results and Comparisons of Two Intergroup Ewing's Sarcoma Studies. - *Cancer,* **vol 66:** 887-893, 1990.

CHANG F, SYRJÄNEN S, TERVAHALTA, et al. Tumourigenesis associated with P53 tumour suppressor gene. *Br. Journal of Cancer* **vol64:**653-661. 1993.

CHEN C-H, GEORGE SL. The Bootstrap and Identification of Prognostic Factors Via Cox's Proportional Hazards Regression Model. *Statistics in Medicine,* **vol 4:** 39-46, 1985.

COFFIN CM, DEHNER LP, Neurogenic tumor of soft tissue in *: Pediatric Soft Tissue Tumors*. Coffin CM, Dehner LP, O'Sehea PA, (eds) Baltimore Willians Wilkins 1997, 87-112.

DAUGAARD S, KAMBY C, SUNDE LM, et al. Ewing Sarcoma - A retrospective study of hystological and imunohistochemical factors and their relation to prognosis. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology.* **vol 414:** 243-251, 1989.

DEHNER L P. Primitive Neuroectodermal Tumor and Ewing Sarcoma. *The Americam Journal of Surgical Pathology,***vol 17:** 1-13, 1993.

DEVANEY K, ABBONDANZO S, SHEKITIKA KM, et al. MIC-2 Detection in Tumors of Bone and Adjacent Soft Tissues. *Clinical Orthopaedics and Related Research* **vol 310:** 176-187, 1995.

DELATTRE O, ZUGMAN J, MELOT T, et al. The Ewing Family of Tumors A Subgroup of Small-Round-Cell Tumors Defined by Specific chimeric Transcripts. *New England Journal of Medicine,* **vol: 331**: 294-299, 1994

DELEPINE N, DESBOIS JC, DELEPINE G. - Progrés Therapeutiques recents Dans le Sarcome D'Ewing de L'Enfant et de L'Adolescent.- *Annales de Pediatrie* **vol 37 N° 9:** 579-582, 1990.

EHARA S, KATTAPURAM S, EGGLIN TK. -Ewing's Sarcoma, radiografic patern of healing and bony complications in patients with long-term survival. *Cancer,* **vol 68:** 1531-1535, 1991.

ENNEKING WP, SPAINER SS, GOODMAN MA. -A system for the surgical staging of musculoskelectal sarcoma. *Clinical Orthopaedics and Related Research,* **vol 153:** 106-120, 1980

EVANS RG, NESBIT EM, GEHAN EA et al. Multimodal Therapy for the Management of Localized Ewing Sarcoma of Pelvic and Sacral Bones: A Report From the Second Integroup Study. *Journal of Clinical Oncology* **vol 9, N° 7:** 1173-1180, 1991.

FELLINGER EJ, GARIN-CHESA P, TRICHE T, HUVOS AG et al. immunohistochemical analysis of ewing's Sarcoma cell surface antigen p30/32^{MIC-2}- *Americam Journal of Pathology* ,**vol 139, N° 2:** 317-325, 1991.

FECHNER RE, MILLS S E. Atlas of Tumor Pathology - Tumors of the Bone and Joint. *Air Force Institute of Pathology,* 3° Edition, 1993, 296pp.

FELLINGER EJ, GARIN-CHESA, GLASSER DB et al. Comparison of Cell Surface Antigen HBA-71 (p30/32^{MIC-2}-) Neuron-Specific Enolase, and Vimentin in the Immunohistochemical Analysis of Ewing's Sarcoma of Bone. *The Americam Journal of Surgical Pathology* **vol 16, N° 8:** 746-755, 1992.

FLETCHER RH, FLETCHER SW, WAGNER EH. *Epidemiologia Clínica.* 3ª edição. Porto Alegre, Artes Médicas, 1996. 280pp.

FRASSICA F, PRITCHARD D, SCHOMBERG P, et al. Ewing Sarcoma of the Pelvis. *The Journal of Bone and Joint Surgery* , **vol 75-A, N°10:** 1457-1465, 1993.

GOODWIN M.I. - A case of Metatarsal Ewing Sarcoma. *Acta Orthopaedica Scandinavica,* **vol 61 (2) :**187-188, 1990.

HARA S, ISHII E, TANAKA S, YOKOYAMA J, et al. - A Monoclonal Antibody Specifically Reactive with Ewing's Sarcoma. *Br. Journal of Cancer,* **vol 60:** 875-879, 1989.

HARTMANN K R, TRICHE TJ, KINSELA TJ, et al.- Prognostic Value of Histopathologiy in Ewing's Sarcoma. *Cancer,* **vol 67:** 163-171, 1991.

HESS E, COHEN C, DeROSE P.B, et al- Nonspecificity of p30/32^{MIC-2}- Immunolocalization With 013 Monoclonal Antibody in the Diagnosis

of Ewing's Sarcoma: Application of algorithmic Immunohistichemical analysis. *Applied Immunohistochemistry* , **vol 5 (2):** 94-103, 1997.

HEIJ HA, VOS A, KRAKER J, et al- Prognostic factors in surgery for pulmonary metastases in children. *Surgery,* **vol 115 (6):**687-693, 1994.

HOROWWITZ ME, NEFF JR, KUN LE.;- Ewing's Sarcoma, Radiotherapy Versus Surgery for Local Control. *Pediatrics Clinics for North America,* **vol 38 (2):** 365-380, 1991.

JAROS E, LUNEC J, PERRY R H, et al - p53 protein overexpression identifies a group of central primitive neuroectodermal tumors with poor prognosis. *Br.j.Cancer ,* **vol 67:** 1993.

KISSANE J M, ASKIN F B, FOULKES M, et al. Ewing's Sarcoma of Bone : Clinicalpathologic Aspects of 303 Cases from the Intergroup Ewing's Sarcoma Study. *Human Pathology* **vol 14 (9):** 773- 779, 1983)

KUDO M. Neuroectodermal Differentiation in " Extraskeletal Ewing's Sacoma". *Acta Pathologica Japonica,* **vol 39 (12):**795-808,1989.

LADANYL M, HEINEMANN SF, HUVOS AG, et al. Neural Differentiation in Samall Round Cell Tumors of Bone and Soft Tissue With the Translocation t(11:22)(q24:12): An Immunohistochemical Study of 11 cases. *Human Pathology,* **vol 21 (12) :**1245-1251,1990.

LEESON M C, SMITH M J. - Ewing's Sarcoma of the Foot. *Foot and Ankle,* **vol 10 (3):**147-151, 1989.

LLOMBART-BOSCH A, LACOME M J, PEYDRO-OLAYA, et al.- Malignant peripheral neuroectodermal tumors of bone than Askin's neoplasm: characterization of 14 new cases with immunohistochemistry and electron microscopy. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology,* **vol 412:** 421-430, 1988.

LLOMBART-BOSCH A, CONTESSO G, HENRY-AMAR M, et al. Histological predictive factors in Ewing's Sarcoma of bone and clinicopathological correlations,(a retrospective study of 261 cases). *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology,* **vol 409:**627-640, 1986.

LLOMBART-BOSCH, A.; CONTESSO, G; PEYDRO-OLAYA, A .Histology immunohistochemistry, and electron microscopy of small round cell tumors of bone. *Semin. Diagn. Pathology,* **vol 13:** 153-170, 1996.

LUMADUE J A, ASKIN FB, PERLMAN EJ. - Mic-2 Analysis of Samall Cell Carcinoma. *Americam Journal of Clinical Pathology,* **vol 102 (5):**692-694, 1994.

MCMANUS AP, GUSTERSON BA, PINKERTON CR, et al. The Molecular Pathology of Small Round-Cell Tumors___Relevance to Diagnosis, Prognosis, and Classification (Review Article) *Journal of Pathology* **vol: 178**, 116-121, 1996.

METZE K. Methodological problems of grading tumor regession: responders versus non-responders. *Journal of Cancer Research Clinical Oncology.* Aceito para publicação em 1998.

MUNHOZ A, MADERO L, AMAYA J, et al. – Local Control and Survival of Ewing's Sarcoma in Children with Radiotherapy and Chemoteraphy without Radical Surgery. *Acta Oncologica,* **vol 28:**245-248, 1989.

NAVARRO S, CAVAZZANA AO, LLOMBART-BOSCH A, et al.Comparison of Ewing's Sarcoma of Bone and Peripheral Neuroepithelioma - An immunocytochemical and Ultrastructural Analysis of Two Primitive Neuroectodermal Neoplasms. *Arch. Pathol. Lab. Med,* **vol 118:**608-615, 1994

ODA Y, TSUNEYOSHI M. A Comparative Study of Nuclear Morphometry and Proliferating Activity in Neuroectodermal Tumors of Bone and Ewing's Sarcoma of Bone. *General Diagnostics Pathology* **vol 141:** 121-129, 1995.

PATRICIO MB, VILHENA M, NEVES M, et al.- Ewing's Sarcoma in Children: Twenty - Five Years of Experience at Instituto Potuguês de Oncologia de Francisco Gentil (IPFG). *Journal of Surgical Oncology,* **vol 47:**37-40, 1991.

PICCI P, ROUGRAFF BT, BACCI G, et al. - Prognostic Significance of Histolopathologic Response to Chemotherapy in Nonmetastic Ewing's Sarcoma of Extremities. *Journal of Clinical Oncology,* **vol 11 (9):** 1763-1769, 1993.

RAMANI P, RAMPLING D, LINK M. - Immunohistochemical study of 12E7 in small round-cell tumors of childhood: an assessment of its sensitivity and specificity. *Histopathology,* **vol 23:**557-561, 1993.

REINUS W.R, GILULA LA, DONALDSON S, et al.- Prognostic Features of Ewing Sarcoma on Plain Radiograph and Computed Tomography Scan after Initial Treatment.- A Pediatric Study Group (8346). *Cancer,* **vol 72 (8):**2503-2510, 1993.

ROESSNER A, JÜRGENS H. Round Cell Tumor of Bone *Pathology Research Practice* **vol 189:** 1111-1136, 1993

ROSEMBERG A.E. - Primary Malignant Bone Tumors. *Current Opinion in Rheumatology,* **vol 2:**102-110,1990.

SCHIMIDT D, HERRMANN C, JÜRGENS H, et al. Malignant Peripheral Neuroectodermal Tumor and Its Necessary Distinction From Ewing's Sarcoma. *Cancer,* **vol 68:**2251-2259,1991.

SHAJOWICZ F. Histological Typing of Bone Tumors. (World Health Organization) International Histological Classification of Tumors.- *Springer- Verlag.* New York, 2° Edition, 1993. 128pp.

SHAJOWICZ F. Tumors and Tumorlike Lesions of Bone - Pathology - Radiology and Treatment 2° Etition. *Springer - Verlag* New York 1994, 649pp.

SHANFELD RL, EDELMAN J, WILLIS JE, et al. Immunohistochemical Analysis of Neural Markers in Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumors (pPNET) Without Light Microscopic Evidence of Neural Differentiation. *Applied Immunoshistochemistry,* **vol 5 (2):**78-86, 1997.

SILVERMANN JF, BERNS LA, HOLBROOK CT, et al. Fine Needle Aspiration Cytology of Primitive Neuroectodermal Tumors, A Report of Three Cases. *Acta Cytologica,* **vol 36, N° 4:**541-550, 1992.

SIMON R, ALTMAN DG. - Statistical aspects of prognostic factor studies in oncology *Br. J. Cancer* **vol 69 :** 979-985, 1994

STEVENSON AJ, CHATTEN J, BERTONI F, et al. CD99 (p30/32^{MIC-2}) Neuroectodermal/ Ewing's Sarcoma Antigen as an Immunohistochemical Marker - Review of More than 600 Tumors and the Literature Experience. *Applied Immunoshistochemistry,* **vol 2 (4):**231-240, 1994.

STREGE D, HANEL DP, VOGLER C, et al.- Ewing's Sarcoma in a Phalanx of an Infant's Finger. *The Journal of Bone and Joint Surgery,* **vol 71-A n°8:**1262-1265, 1989.

TAYLOR C, PATEL K, JONES T, et al. - Diagnosis of Ewing's Sarcoma and Peripheral Neuroectodermal Tumor Based on the Detection of t(11:22) Using Florescence *In Situ* Hybridisation. *Br. J. Cancer,* **vol 67:**128-133, 1993.

TSOKOS M, LINNOILA RI, CHANDRA RS, et al. Neuron Especific Enolase in the Diagnosis of Neuroblastoma and Other Small, Round-Cell Tumors in Children. *Human Pathology,* **vol 15 (6):**575-584, 1984.

USHIGOME S, SHIMODA T, NIKAIDO T, et al.- Primitive Neuroectodermal Tumors of Bone and Soft Tissue - With Reference to

Histologic Differentiation in Primary or Metastatic Foci. *Acta Pathologica Japonica,* **vol 42 (7):**483-493, 1992.

USHIGOME S, SHIMODA T, TAKAKI K, et al.- Immunohistochemical and Ultrastructural Studies of the Histogenesis of Ewing's Sarcoma and Putatively Related Tumors. *Cancer,* **vol 64 (1):**52-62, 1989.

UNNI KK. - Dahlin's Bone Tumors. General Aspects and Data on 11087 Cases. *Lippincott - Raven* 1996, 463pp .

SUMMARY

SUMMARY

The objective of this paper was evaluate the morphologic and immunohistochemical profile and its relationship with the prognosis of Ewing Sarcoma.

32 patients were studied (16 patient of each sex), everybody white, with tumor of small round cells, with diagnosis of Ewing Sarcoma and PNET, in a period between 1989 and 1997.

Clinically was appraised with relationship to the age, sex, time of history, topography of the lesion, presence of metastasis at the diagnosis, and Enneking staging.

The hystopathologic study was evaluated with relationship of: cellular atipia, presence of Homer-Wright rosettes, spontaneous tumoral necrosis, and mitotic index. It was also evaluated the presence of intracitoplasmatic gligogen and the pattern of reticulin fibers.

At the immunohistochemical study 12 cellular markers were used for differentiation analysis: mesenquimal, epitelial, neural, glial, and leucocyte according to the following relationship: I came (vimentin); Cam-5.2 (keratin); SNE (specific neural enolase);S-100 protein, Leu-7 ,Syn (Synaptofisin), NF (neurofilament), CGR (cromogranin), GFAP (filament of glial protein); CD99 (glicoprotein of the cellular membrane MIC-2); LCA (Leucocyte common antigen). It was also analyzed through of that method the Bcl-2 (gem that controls the cellular apopitosis).

Cox Mantel's statistical method, and sobrevida of Kaplan Meyer was used, for evaluation of prognostics factors.

The patients' age varied from 02 to 36 years with 15,11 year-old average. The location of the tumor, in the axial skeleton, showed tendency to the bad prognostic in our series.

Of the correlated factors, the one of the most immportant were markers of neural differentiation: a morphologic one, characterized by the presence of Homer-Wright rosettes and other the immunohistochemic, SNE marker.

With those markers we make a called Index of Neural Differentiation (NDI) with values ranged from 0 to II, where the degree 0 means the absence of the markers, the degree I the presence of at least one of those markers, and the degree II with the presence of these two neural markers. This index was shown very expressive when applied in our patients p=0,0028.

Also the presence of metastasis at diagnosis, was a clinical factor that committed the survival in our patients. Practically all of these dead in the first 20 months of disease, although without statistic value (p = 0,2312). The metastasis is a clinical indicator of the spread of the tumor in another organs, and therefore with a more difficult to control, even with the chemo and surgical treatment.

After the evaluations of all the available factors for analysis with the prognostic, we have the following conclusions:

1–The axial skeleton, and metastasis at diagnosis, can predict a worse prognostic evolution (survival smaller than 18 months).

2– Neural differentiation characterized by presence of Homer-Wright rosettes and SNE were defined as worsening prognostic factor.

3–Neural Differentiation Index (NDI), was definitive as showing the worsening of the prognostic as it increased graduation.

4–The association of DNI and metastasis, spontaneous tumoral necrosis and the location in the axial skeleton of the neoplasia, that are factors of significant prognosis in the literature, has important prognostic evaluation when they are together comparing with worse prognosis.

ANEXO 1

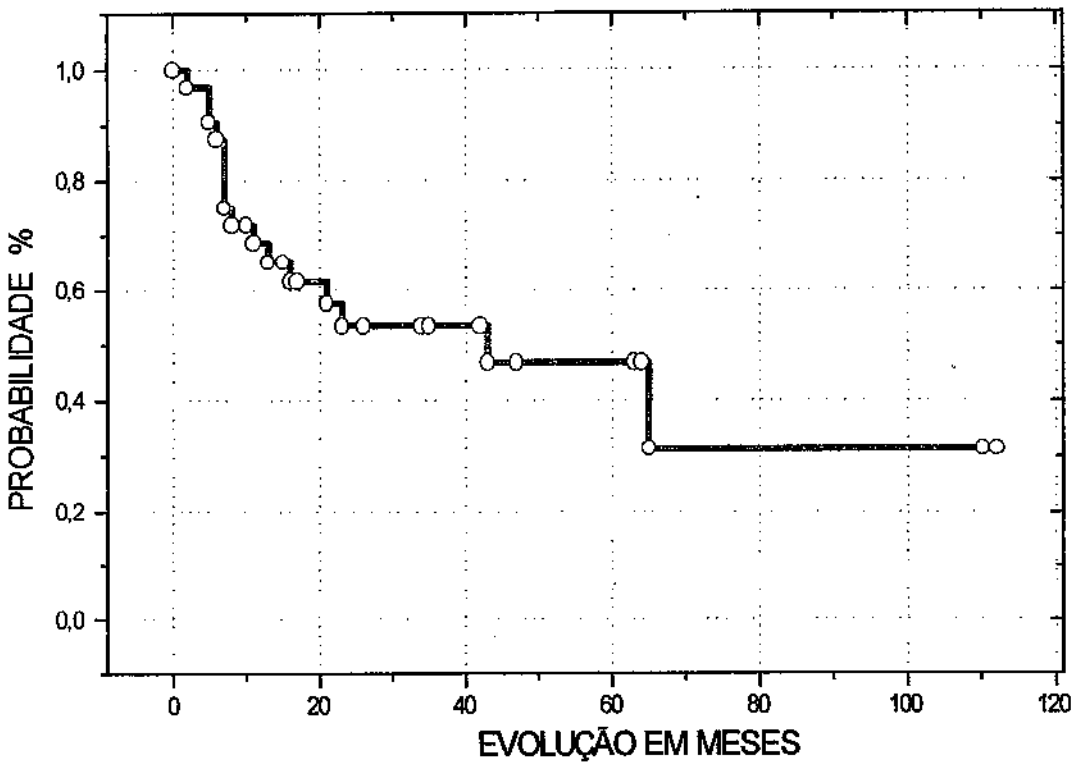


Gráfico 43. O gráfico mostra a evolução da sobrevida global dos 32 pacientes deste estudo.

	IDADE	DIAGNOST	ENNEK	LOCAL	EVOL	VIVO	META	NSE	S-100	VIM	LC	CAM	Leu-7	NF	CGR	SYN	GFAP	BCL	MIC-2	NEC	ROSETA	CITO	MIT	PAS	ÓBITO
		MESES																							
1	11	5	IIB	TIBIA	63	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
2	18	2	IIIB	CLAVICUL	23	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	N.ª	0	1	9	1	1
3	2	6	IIIB	ILIACO	21	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
4	5	2	IIB	FEMUR	6	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	0	1	1
5	13	1	IIB	FEMUR	64	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3	0	0
6	16	3	IIB	UMERO	110	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	1	0
7	3	4	IIB	ESCAPULA	42	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
8	11	5	IIB	FEMUR	112	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	3	0	0
9	8	3	IIB	UMERO	16	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	2	0	1
10	10	9	IIB	FEMUR	43	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	N.ª	0	0	N.ª	1	0
11	3	4	IIB	VERTEBR	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1
12	15	2	IIB	FEMUR	35	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	N.ª	0	0	3	0	0
13	14	4	IIB	TIBIA	43	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0	1	1	1
14	8	5	IIB	COSTELA	11	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0	1	4	0	1
15	8	1	IIB	FIBULA	13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	1	22	1	1
16	8,8	4	IIB	CALCANEO	26	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	N.ª	0	0
17	19	8	IIB	TIBIA	7	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	9	0	1
18	30	2	IIB	FEMUR	7	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	2	0	1
19	20	4	IIIB	FEMUR	17	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	3	0	0
20	25	9	IIB	TIBIA	65	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	1	1
21	5	5	IIB	FEMUR	7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	4	1	1
22	19	4	IIB	FEMUR	5	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
23	8	5	IIB	FEMUR	47	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0
24	26	2	IIIB	TIBIA	7	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	3	1	1
25	22	2	IIIB	ILIACO	5	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	2	1	1	N.ª	1	1
26	22	24	IIB	FEMUR	26	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2	0	0	1	1	0
27	16	2	IIIB	ILIACO	11	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	2	0	0	1	0	0
28	33	7	IIB	MANDIBUL	34	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	3	0	0
29	9	1	IIB	TIBIA	15	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	2	0	0
30	11	3	IIB	FIBULA	10	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	5	0	0
31	12	1	IIB	FEMUR	16	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	N.ª	0	1	4	1	0
32	4	36	IIB	VERTEBR	8	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	1

TABELA 25. A tabela mostra o resultado global da avaliação, quanto à idade, cor, tempo de história clínica, estadiamento (Enneking 1983); evolução, presença de metástase, avaliação histopatológica e pesquisa de anticorpos. (0) negativo, (1) positivo, (N^A.) não avaliado.

ANEXO I

PAC	NSE	S-100	VIM	LC	CAM	LEU-7	NF	CGR	SYN	GFAP	BCL	MIC-2
PRESENÇA	34,37%	25,00%	75,00%	0,00%	9,37%	9,37%	3,12%	43,75%	21,87%	12,50%	6,25%	72%
1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
8	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
9	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
10	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
14	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
16	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
17	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
19	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
20	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
21	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
22	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
23	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
25	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
26	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
27	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
29	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
30	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
31	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1
32	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

TABELA 26. A tabela mostra o resultado global da avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos, e a porcentagem do aparecimento de cada um. (0) ausente; (1) presente.

	IDADE	DIAGNOS	ENNEK	LOCAL	EVOL	VIVO	META
		MESES					
1	11	5	IIB	TIBIA	63	1	0
2	18	2	IIIB	CLAVICUL	23	0	1
3	2	6	IIIB	ILIACO	21	0	1
4	5	2	IIB	FEMUR	6	0	0
5	13	1	IIB	FEMUR	64	1	0
6	16	3	IIB	UMERO	110	1	0
7	3	4	IIB	ESCAPULA	42	1	0
8	11	5	IIB	FEMUR	112	1	0
9	8	3	IIB	UMERO	16	0	0
10	10	9	IIB	FEMUR	43	1	0
11	3	4	IIB	VERTEBR	2	0	0
12	15	2	IIB	FEMUR	35	1	0
13	14	4	IIB	TIBIA	43	0	0
14	8	5	IIB	COSTELA	11	0	0
15	8	1	IIB	FIBULA	13	0	0
16	8,8	4	IIB	CALCANEO	26	1	0
17	19	8	IIB	TIBIA	7	0	0
18	30	2	IIB	FEMUR	7	0	0
19	20	4	IIIB	FEMUR	17	1	1
20	25	9	IIB	TIBIA	65	0	0
21	5	5	IIB	FEMUR	7	0	0
22	19	4	IIB	FEMUR	5	0	0
23	8	5	IIB	FEMUR	47	1	0
24	26	2	IIIB	TIBIA	7	0	1
25	22	2	IIIB	ILIACO	5	0	1
26	22	24	IIB	FEMUR	26	1	0
27	16	2	IIIB	ILIACO	11	1	1
28	33	7	IIB	MANDIBUL	34	1	0
29	9	1	IIB	TIBIA	15	1	0
30	11	3	IIB	FIBULA	10	1	0
31	12	1	IIB	FEMUR	16	1	0
32	4	36	IIB	VERTEBR	8	0	0

TABELA 27. A tabela mostra o resultado da avaliação clínica, quanto à idade, tempo de doença, localização topográfica do tumor, evolução em meses, e presença de metástase ao diagnóstico.

PACIENTES	NECROSE	ROSETA	ATIPIA	MITOSE	PAS
1	0	0	0	6	0
2	N.ª	0	1	9	1
3	0	0	0	0	1
4	1	0	0	0	1
5	0	0	1	3	0
6	1	0	0	1	1
7	0	0	0	1	1
8	1	0	0	3	0
9	0	1	0	2	0
10	N.ª	0	0	N.ª	1
11	1	0	0	0	1
12	N.ª	0	0	3	0
13	1	0	0	1	1
14	1	0	1	4	0
15	1	0	1	22	1
16	0	0	0	N.ª	0
17	1	1	0	9	0
18	1	1	0	2	0
19	1	0	0	3	0
20	1	0	0	1	1
21	1	1	0	4	1
22	1	0	0	1	1
23	1	0	0	0	1
24	1	0	0	3	1
25	1	1	1	N.ª	1
26	1	0	0	1	1
27	1	0	0	1	0
28	1	0	0	3	0
29	1	1	0	2	0
30	1	1	0	5	0
31	N.ª	0	1	4	1
32	0	0	0	2	0

TABELA 28. A tabela mostra o resultado da avaliação histopatológica, quanto à presença de necrose tumoral espontânea, rosetas, atipia celular, mitoses, e resultado histoquímico do glicogênio intracitoplasmático (PAS).
(0) ausente; (1) presente; (N.ª) não avaliadas.

	ROSEMBERG et al 1994	COFFIN et al 1997	BARBI et al 1998
VIM	93,6		**75%**
CAM	17%	< 10%	**9,37%**
NSE	68,50%		**34,37%**
S100	24,40%	40%	**25%**
Leu7	28,20%	40%	**9,37%**
NF	7,10%	40%	**3,12%**
CGR	1,30%	20%	**43,75%**
SYN	2,60%	40%	**21,87%**
GFAP	0%	10%	**12,50%**
LCA	0%	0%	**0**
MIC2	87,10%	90-100%	**72%**
Bcl2	53,90%		**6,25%**

Tabela 29. A tabela mostra a comparação do resultado final do trabalho com a literatura.