

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**ADEMAR TAKAHAMA JUNIOR
CIRURGIÃO DENTISTA**

**ANÁLISES CLINICOPATOLÓGICA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DE OSTEOSARCOMAS DE
CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
grau de Mestre em Estomatopatologia,
área de concentração em Estomatologia

PIRACICABA – SP

2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ADEMAR TAKAHAMA JUNIOR
CIRURGIÃO DENTISTA

ANÁLISES CLINICOPATOLÓGICA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DE OSTEOSARCOMAS DE
CABEÇA E PESCOÇO

Este exemplar foi devidamente entregue
de acordo com a Resolução 009-05/2002
em 18/09/2002
Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
grau de Mestre em Estomatopatologia,
área de concentração em Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes

Banca Examinadora: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes

PIRACICABA –SP

2002

200249584

UNIDADE 80
Nº CHAMADA THUNICAMP
T139a
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 51217
PROC 16.837/00
C _____ DY _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 23/10/02
Nº CPD _____

CM00175040-0

BIBD. 265153

Ficha Catalográfica

T139a

Takahama Junior, Ademar.

Análises clinicopatológica e imunohistoquímica de osteossarcomas de cabeça e pescoço. / Ademar Takahama Junior. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
xviii, 136p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Prognóstico. 2. Quimioterapia. 3. Radioterapia. 4. Ossos faciais - Cirurgia. I. Lopes, Márcio Ajudarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 17 de Julho de 2002, considerou o candidato ADEMAR TAKAHAMA JUNIOR aprovado.

1. Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

A handwritten signature in dark ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to be "Marcio Ajudarte Lopes".

2. Prof. Dr. LUIZ PAULO KOWALSKI

A handwritten signature in dark ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to be "Luiz Paulo Kowalski".

3. Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS

A handwritten signature in dark ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to be "Pablo Agustin Vargas".

Dedico este trabalho aos meus pais

Ademar e Tereza, e à minha irmã Claudia

pelo apoio e incentivo na conquista

de mais um objetivo.

Agradecimento especial ao
Prof. Dr. Márcio Lopes Ajudarte,
pela orientação, dedicação, ensinamentos,
paciência e por me mostrar os caminhos
de como me tornar um bom profissional.

"Que ninguém se engane,
só se consegue a simplicidade
através de muito trabalho"

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum**, Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas.

À **Prof.^a Dr.^a Altair Antoninha Del Bel Cury**, Coordenadora de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas.

Ao **Prof. Dr. Pablo Augustin Vargas**, Coordenador do curso de Pós-Graduação em Estomatopatologia e professor da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida** pelos grandes ensinamentos.

Aos demais professores do departamento – **Prof. Dr. Edgard Graner, Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, Prof. Dr. Osvaldo di Hipólito Júnior e Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**.

Ao **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, chefe do departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo - São Paulo.

Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares** e ao **Dr. Clóvis Antonio Lopes Pinto** do departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo - São Paulo.

À **Sra. Hirde Contesini**, chefe do Setor de Arquivo Médico e Estatístico do Hospital de Câncer A.C. Camargo - São Paulo.

Às funcionárias do Centro de Estudos do Hospital do Câncer **Raimunda Nonata Pereira e Inês N. Nishimoto**, pela realização da análise estatística.

Ao **Dr. Fábio de Abreu Alves** e ao doutorando **Cléverson Roberto de Andrade** pela grande contribuição para a realização deste trabalho.

À técnica de laboratório **Ana Cristina do Amaral Godoy** e ao doutorando **Fábio Ramôa Pires** pelo auxílio nas reações de imunohistoquímicas.

Aos professores do departamento de Endodontia, **Alexandre Augusto Zaia, Caio Cezar Randi Ferraz, Francisco José Souza Filho, Fabrício Batista Teixeira e Brenda P. F. A. Gomes**, pelo grande incentivo.

Aos funcionários e amigos do departamento - **Adriano, Cida, Eli Cristina, João, Maria Helena, Rogério, Rosa Fornasier e Rosa Scalco**.

Aos amigos do mestrado - **Andresa, Eduardo, Fábio Ito, Fábio Ornelas, Francisco, Lucinei, Luciana e Silvia**, pelos momentos de aprendizado e diversão.

Aos demais amigos da pós-graduação - **Ana Lúcia, Cláudio, Danyel, Dawton, Estela, Jorge, Juliana, Júnior, Karina Zecchin, Karina Neves, Marcelo, Michele Agostini, Michele Pereira, Paola, Paulo Bonan, Paulo Faria e Sabrina**.

Aos amigos da graduação - **Alexandre, Alex, Ana Cecília, Ana Paula, Carlos, Fabíola, Laura, Marcelo Zillo, Marlise, Neimar e Paula**.

SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	05
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	07
2.1. Epidemiologia.....	07
2.2. Etiologia.....	08
2.3. Características Clínicas.....	10
2.4. Características Radiográficas.....	14
2.5. Características Histopatológicas.....	15
2.6. Tratamento.....	19
2.7. Recorrência Local.....	22
2.8. Metástase.....	23
2.9. Prognóstico.....	24
2.10. Marcadores Moleculares.....	26
2.10.1. p53.....	27
2.10.2. MDM2.....	30
2.10.3. CDK4.....	32
2.10.4. PCNA.....	33
2.10.5. Ki67.....	34
3. PROPOSIÇÃO.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Análise Histopatológica.....	37
4.2. Imunohistoquímica.....	38
4.3. Análise Estatística.....	40
4.3.1. Correlação de Frequência.....	40
4.3.2. Sobrevida Global.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. Características Clínicas.....	41
5.2. Características Histopatológicas.....	47
5.3. Características Imunohistoquímicas.....	54

5.3.1. p53.....	54
5.3.2. MDM2.....	54
5.3.3. CDK4.....	54
5.3.4. PCNA.....	54
5.3.5. Ki67.....	55
5.4. Tratamento.....	64
5.5. Recorrência Local e Metástase.....	64
5.6. Situação Clínica.....	66
5.7. Correlação de Frequência.....	71
5.8. Sobrevida Global.....	76
6. DISCUSSÃO.....	97
7. CONCLUSÕES.....	111
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
9. ANEXOS.....	131
9.1. Anexo 1.....	131
9.2. Anexo 2.....	133
9.3. Anexo 3.....	135

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características clínicas, histopatológicas e a expressão imunohistoquímica das proteínas p53, MDM2, CDK4, PCNA e Ki67, em osteossarcomas de cabeça e pescoço, verificando possíveis fatores associados ao prognóstico. Foram selecionados 25 casos de osteossarcoma de cabeça e pescoço atendidos no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo de São Paulo. A média de idade dos pacientes foi de 29 anos, com discreta predominância no gênero feminino. Os locais mais acometidos foram a mandíbula (60%) e a maxila (36%). Histologicamente, 72% dos casos foram do tipo condroblástico e 28% osteoblástico. De acordo com o grau de malignidade, 52% dos casos foram classificados como de grau intermediário, 44% de alto grau, e apenas 1 caso (4%) de baixo grau. A positividade imunohistoquímica foi observada em 52% dos casos para p53, em 24% para MDM2, 84% para CDK4, 92% para PCNA e 88% para Ki67. A principal forma de tratamento foi a cirurgia, realizada em 84% dos casos, algumas vezes em associação com a quimioterapia e/ou radioterapia. Cinco pacientes (20%) apresentaram recorrência local após o tratamento e quatro (16%) desenvolveram metástase à distância. A correlação de frequência mostrou que os principais fatores associados à situação clínica do paciente foram recorrência local e metástase à distância, onde todos os 5 pacientes com recorrência local e 3 dos 4 que desenvolveram metástase evoluíram para óbito. A sobrevida global em 5 e 10 anos foi 59% e 49%, respectivamente. Os fatores mais importantes relacionados à sobrevida foram a história de radioterapia prévia, tumores do tipo osteoblástico e presença de recorrência local.

Abstract

The purpose of our study was to analyse the clinical and histopathological features and the immunohistochemical expression of p53, MDM2, CDK4, PCNA and Ki67 in head and neck osteosarcomas, verifying possible prognostic factors. Twenty-five cases of head and neck osteosarcomas attended at the Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology of Cancer Hospital A.C. Camargo - São Paulo - Brazil, were selected. The mean age of the patients was 29 years, with a slight predominance in women. The most common sites were the mandible (60%) and the maxilla (36%). The histopathological findings showed that 72% of the tumors were chondroblastic type and 28% were osteoblastic type. According to the malignancy grade, 52% of the cases were classified as intermediate grade, while 44% were high grade and just one case (4%) was low grade. The immunopositivity was 52% of the cases for p53, 24% for MDM2, 84% for CDK4, 92% for PCNA and 88% for Ki67. The main treatment approach was surgery, performed in 84% of the cases, sometimes in association with chemotherapy and/or radiotherapy. Five patients (20%) presented local recurrence and four (16%) developed distant metastasis. The correlation of frequency showed that the main factors associated with the patients status were the local recurrence and the distant metastasis, where all the 5 patients who presented local recurrence and 3 out of 4 patients who developed distant metastasis died of the disease. Overall survival in 5 and 10 years was 59% and 49%, respectively. The most important prognostic factors for survival were the previous history of radiotherapy, osteoblastic-type tumors and local recurrence.

1. Introdução

O osteossarcoma é um tumor ósseo maligno, agressivo e raro que acomete principalmente ossos longos de crianças e adultos jovens (HUVOS, 1991). A incidência desse tumor na região de cabeça e pescoço é extremamente rara, representando cerca de 10% de todos os osteossarcomas (WANEBO et al., 1992). A faixa etária dos pacientes acometidos pelo osteossarcoma na região de cabeça e pescoço está entre a terceira e a quarta décadas de vida, cerca de uma década a mais quando comparado aos osteossarcomas de ossos longos (DELGADO et al., 1994).

Clinicamente, o principal sinal do osteossarcoma de cabeça e pescoço é o aumento de volume da região, podendo ser acompanhado de dor (GARRINGTON et al., 1967). Microscopicamente caracteriza-se pela presença de um estroma maligno, composto por células pleomórficas, hipercromáticas, com a presença de mitoses e osteoblastos atípicos (KASSIR et al., 1997). A presença de material osteóide é considerada como critério para o diagnóstico de osteossarcoma (LICHTENSTEIN et al., 1943; MARK et al., 1991; MARDINGER et al., 2001). De acordo com as características do estroma, os osteossarcomas são classificados em osteoblástico, condroblástico e fibroblástico (UNNI & DAHLIN, 1989).

A principal forma de tratamento para os osteossarcomas é a remoção cirúrgica do tumor com amplas margens de segurança (CRAFT, 1992). A introdução da quimioterapia utilizando drogas como o metotrexate, cisplatina, doxorubicina e ifosfamida, teve um impacto positivo no prognóstico dos pacientes com osteossarcomas de ossos longos (GOORIN et al., 1985). No entanto, a eficácia da quimioterapia em osteossarcomas de cabeça e pescoço ainda é discutida.

Alterações em genes envolvidos no controle do ciclo celular têm sido associadas na patogênese de muitos tipos de tumor, incluindo os osteossarcomas (CORDON-CARDO, 1995; HALL & PETERS, 1996). O gene mais estudado e mais freqüentemente relacionado à neoplasias malignas é o P53 (NIGRO et al., 1989). Além do P53, genes localizados no braço longo do cromossomo 12 como o MDM2 (murine double minute 2) e o CDK4 (cyclin dependent kinase 4) (OLINER et al., 1992; LEACH et al., 1993; MATSUSHIME et al., 1994), têm sido encontrados alterados em osteossarcomas (WUNDER et al., 1999; GAMBERI et al., 2000).

2. Revisão da Literatura

2.1. Epidemiologia

Os sarcomas são neoplasias malignas originárias de tecido mesenquimal e podem ser classificadas de acordo com o tecido de origem como fibrossarcoma, rabdomiossarcoma, leiomiossarcoma, condrossarcoma, osteossarcoma, entre outros. Estas neoplasias raramente acometem a região de cabeça e pescoço, representando menos de 1% dos tumores malignos dessa região (SETZEN et al., 1979).

O osteossarcoma (OS) é um tumor ósseo maligno incomum que ocorre mais freqüentemente em ossos longos de crianças e adultos jovens. No entanto, pode afetar qualquer osso do esqueleto (HUVOS, 1991). Segundo UNNI (1996) e DORFMAN & CZERNIAK (1998), o osteossarcoma representa 40% a 60% dos tumores ósseos malignos (COHEN, 1993) e 20% de todos os tumores ósseos. O número de novos casos de osteossarcoma por ano nos Estados Unidos é de aproximadamente 7.400, provocando cerca de 4.200 mortes (ANTMAN et al., 1989).

A ocorrência desse tumor na região de cabeça e pescoço é mais rara, representando aproximadamente 10% dos osteossarcomas, afetando principalmente maxila e mandíbula (VEGE et al., 1991; WANEBO et al., 1992; DELGADO et al., 1994). Por outro lado, em uma série de 1200 osteossarcomas revisados em um período de 51 anos, observou que apenas 5,4% estavam localizados na região de maxila e mandíbula (HUVOS, 1991). A incidência estimada de novos casos de osteossarcomas de cabeça e pescoço por ano nos Estados Unidos é de 0,07 em 100.000 pessoas (CLARK et al., 1983).

2.2. Etiologia

Apesar da etiopatogenia do osteossarcoma ser desconhecida, vários fatores têm sido associados ao desenvolvimento desse tumor. Com relação à irradiação utilizada no tratamento de neoplasias, tem sido reportado que o tecido ósseo está freqüentemente presente no campo de tratamento, favorecendo o desenvolvimento de sarcomas, principalmente o osteossarcoma e o fibrossarcoma (UNNI et al., 1996). Segundo UNNI & DAHLIN (1989), o período entre a radioterapia e o aparecimento dos sarcomas pode variar de 3,5 anos até 50 anos, com uma média de aproximadamente 13 anos. Os sarcomas desenvolvidos pós-irradiação são geralmente de alto grau de malignidade (UNNI & DAHLIN, 1989). DICKENS et al. (1990) realizaram um estudo na China onde a incidência de carcinoma de nasofaringe é alta, e observaram 4 casos de osteossarcoma de maxila em 1.000 pacientes tratados com radioterapia.

Desordens benignas pré-existentes como doença de Paget e displasia fibrosa também têm sido relacionados com o desenvolvimento de osteossarcomas (GARRINGTON et al., 1967; UNNI, 1996). No entanto, a incidência de osteossarcomas que surgem em pacientes com doença de Paget é baixa, sendo provavelmente menor que 1% entre todos os osteossarcomas. O crânio é o local principal de ocorrência de osteossarcomas que se desenvolvem após doença de Paget (SALVATI et al., 1993). Os osteossarcomas relacionados à doença de Paget também são geralmente de alto grau de malignidade, tendo conseqüentemente, um prognóstico desfavorável (UNNI & DAHLIN, 1989). UNNI em 1996 relatou que dentre 1.649 pacientes com tumores ósseos, havia em 51 casos condição médica pré-existente, sendo a doença de Paget e radioterapia as mais

freqüentes. Além do osteossarcoma, outros sarcomas como o fibrossarcoma e o fibrohistiocitoma maligno também estão relacionados com a doença de Paget.

Pessoas com história de retinoblastoma na infância também apresentam um risco maior de desenvolvimento de osteossarcomas (GARRINGTON et al., 1967; SALVATI et al., 1977; GOORIN et al., 1985; MALAWER et al., 1989; BRAMWELL, 1995).

Outras anormalidades ósseas como osteocondromatose múltipla, osteomielite crônica, miosite ossificante (SALVATI et al., 1993) e trauma (GARRINGTON et al., 1967; LIVOLSI, 1977; BRAMWELL, 1995) também têm sido relacionadas como fatores de risco para o desenvolvimento de osteossarcomas.

2.3. Características Clínicas

Os osteossarcomas, em geral, afetam principalmente adolescentes. No entanto, pode ser encontrado em qualquer idade, apresentando uma distribuição etária bimodal com pico máximo na segunda década e outro um pouco menor depois dos 50 anos (DORFMAN & CZERNIAK, 1995). Osteossarcoma de ossos longos é o terceiro tumor maligno mais comum em adolescentes (COHEN, 1993), com pico de incidência entre os 10 e 14 anos, coincidindo com o período de máximo crescimento corporal (PARKIN et al., 1993; BRAMWELL, 1995). Atinge principalmente a metáfise distal do fêmur, proximal da tíbia e metáfise umeral (BENNETT et al., 2000).

Na região de cabeça e pescoço o pico de incidência do osteossarcoma é entre a 3ª e 4ª décadas de vida (VEGE et al., 1991; WANEBO et al., 1992). CLARK et al. (1983) relataram que a idade média dos pacientes com osteossarcoma de cabeça e pescoço foi de 34,2 anos. VEGE et al. (1991) observaram idade média de 30,9 anos em estudo realizado na Índia, e CHINDIA et. al. (2001) encontraram idade média de 27 anos em estudo com quenianos. ODA et al. (1997) avaliando osteossarcomas da região de cabeça e pescoço na Universidade de Washington observaram idade média superior ao encontrado em outros trabalhos, correspondendo a 40,9 anos.

Quando o OS desenvolvem após história de radioterapia ou doença de Paget, a idade média dos pacientes é geralmente mais elevada que em outros casos (FRASSICA et al., 1991; MARK et al., 1994; BIELING et al., 1996).

Os osteossarcomas afetam mais comumente homens, numa relação homem:mulher de 1,6:1 (CRAFT, 1992). Na região de cabeça e pescoço parece afetar igualmente os dois gêneros (HA et al., 1999). No entanto, alguns autores relataram uma pequena predileção no

gênero masculino (ODA et al., 1997), enquanto outros mostraram maior ocorrência em mulheres (TANZAWA et al., 1991; BENNETT et al., 2000).

Clinicamente, o primeiro sinal do osteossarcoma de cabeça e pescoço é o aumento de volume da região (GARRINGTON et al., 1967). Outras características também podem estar presentes como dor, parestesia e ulceração (BENNETT et al., 2000).

Segundo estudo de MARDINGER et al. (2001), em todos os 14 casos analisados os pacientes apresentavam um aumento de volume indolor, e todos os casos com envolvimento de corpo mandibular apresentavam também parestesia.

TANZAWA et al. (1991) relataram que além do aumento de volume, a dor estava presente em 3,4% dos pacientes. BENNETT et al. (2000) descreveram dor, ulceração e parestesia dos nervos mentoniano, alveolar inferior e infra-orbitário como as principais características iniciais. Quando em mandíbula, 20% a 25% dos pacientes apresentam parestesia (YAGAN et al., 1985). Outros autores também reportaram porcentagem de parestesia semelhante em outros nervos trigeminais (LINDQVIST et al., 1986; CHEN & LIN, 1992).

A mobilidade dental também pode estar relacionada ao osteossarcoma na mandíbula e maxila, podendo ser, em algumas situações, o primeiro sinal da doença (RUSS & JESSE, 1980; BENNETT et al., 2000). Outros sinais e sintomas menos freqüentes são exoftalmia, febre e perda de peso (BONADONA & DELLA CUNA, 1988; TANZAWA et al., 1991).

O período médio entre o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas até a consulta inicial é de 3 meses (CLARK et al., 1983). No entanto, apesar de ser um tumor agressivo, alguns pacientes apresentaram queixas longas antes do diagnóstico, sugerindo crescimento lento (TANZAWA et al., 1991). O aumento de volume em região facial pode ser percebido rapidamente, devido a problemas estéticos e funcionais (MARDINGER et al., 2001).

Os principais ossos acometidos pelo osteossarcoma na região de cabeça e pescoço são a maxila e a mandíbula (VEGE et al., 1991). TANZAWA et al. (1991) e BENNETT et al. (2000), analisando osteossarcomas de cabeça e pescoço, descreveram maior ocorrência na mandíbula. Entretanto, CLARK et al. (1983) relataram ocorrência semelhante na maxila e mandíbula, correspondendo a 51% e 49%, respectivamente. MARDINGER et al. (2001), estudando 14 osteossarcomas da região de cabeça e pescoço, encontraram 8 casos envolvendo a maxila e 6 a mandíbula.

Com relação à lateralidade, TANZAWA et al. (1991) descreveram que não havia diferença na distribuição quando estavam localizados na mandíbula. No entanto, quando ocorria na maxila, o lado direito foi mais afetado (2:1). De acordo com a região da mandíbula, de 24 casos analisados, 15 ocorreram na região de molares, 7 na região do ramo ascendente e 2 na região de incisivos. BENNETT et al. (2000) também observaram que o corpo e ramo ascendente da mandíbula foram os locais mais afetados. YAGAN et al. (1985) observaram que dois terços dos tumores em mandíbula acometiam a região de corpo, e o terço restante em sínfise, ramo e ângulo. BERTONI et al. (1991) relataram que na maxila os locais mais acometidos eram o processo alveolar e o antro e BENNETT et al. (2000) verificaram uma predileção pela região de caninos e pré-molares.

Os osteossarcomas em maxila tendem a ser maiores do que os mandibulares, e podem se estender para a fossa infratemporal e para o seio maxilar (MARDINGER et al., 2001). Além da maxila e mandíbula, o osteossarcoma pode raramente envolver outros ossos craniofaciais como o esfenóide, etmóide, temporal, frontal, parietal, occipital, orbital, zigomático e processo mastóide (DEFRIES et al., 1979; MARK et al., 1991; HA et al., 1999).

Por outro lado, em ossos longos, os pacientes com osteossarcoma relatam a dor como queixa principal, enquanto que o aumento de volume é encontrado em uma fase mais avançada da doença. Além disso, distúrbios neurológicos, como parestesia, não representam grande significado em osteossarcomas de ossos longos (MARDINGER et al., 2001). Os principais locais acometidos pelos osteossarcomas nessa região são a epífise distal do fêmur, a proximal da tíbia e a proximal do úmero (DAVIS et al., 1994).

Os osteossarcomas se espalham microscopicamente pelo trabeculado ósseo (PEASE et al., 1975; HOFFMAN et al., 1987). Outro local por onde podem se infiltrar é o canal mandibular (YAGAN et al., 1985). Estruturas como o ligamento periodontal, nervo mentoniano e alveolar inferior também podem facilitar a invasão do tumor para tecidos moles adjacentes (MARDINGER et al., 2001).

Raramente, o osteossarcoma pode se apresentar primário de tecidos moles ou de outros órgãos como o coração (LOWRY & McKEE, 1972) e a bexiga urinária (MURAT et al., 1975). O comportamento biológico desses tumores é similar àqueles primários de ossos, mas ocorre em pacientes com idade mais avançada (REYES et al., 1981).

2.4. Características Radiográficas

A imagem radiográfica dos osteossarcomas varia desde áreas radiolúcidas a áreas densas radiopacas com margens irregulares, podendo ser observada três aspectos principais: osteolítico, esclerótico ou misto (YAGAN et al., 1985).

Nos estágios iniciais as alterações são discretas, com pequena variação no padrão do trabeculado ósseo normal, sendo característico um aumento do espaço do ligamento periodontal se os dentes estiverem envolvidos (SPJUT et al., 1971).

LINDQUIST et. al. (1986) consideraram o aumento do espaço do ligamento periodontal, aumento do canal do nervo alveolar inferior e aspecto radiográfico de "raios de sol" quase patognomônicos de osteossarcoma na região de mandíbula e maxila. Na revisão de oito casos realizada por DOVAL et al. (1997), apenas 1 caso apresentou o aspecto radiográfico de "raios de sol". Este aspecto radiográfico também pode aparecer em casos de carcinoma metastático, mieloma múltiplo, sarcoma de Ewing avançado, tuberculose e outras doenças ósseas inflamatórias (HIGH et al., 1978).

PETRIKOWSKI et al. (1995) afirmaram que é difícil distinguir radiograficamente o osteossarcoma de outras lesões ósseas benignas como a displasia fibrosa e a osteomielite, e reportaram que as principais características radiográficas dos osteossarcomas da região de cabeça e pescoço são: margens irregulares, destruição da cortical, destruição da lâmina dura, aumento do espaço do ligamento periodontal e formação de tecido ósseo calcificado (aspecto radiopaco).

A tomografia computadorizada e a ressonância nuclear magnética são exames auxiliares para a observação do envolvimento intra e extramedular, calcificações e invasão

de tecidos adjacentes, principalmente a fossa pterigopalatina, fossa infratemporal e cavidade craniana (BERTONI et al., 1991).

2.5. Características Histopatológicas

Microscopicamente o osteossarcoma caracteriza-se pela presença de um estroma maligno, composto por células pleomórficas, hipercromáticas, com a presença de mitoses e osteoblastos atípicos (KASSIR et al., 1997). A formação de material osteóide é considerada como critério para o diagnóstico de osteossarcoma (LICHTENSTEIN et al., 1943; MARK et al., 1991; MARDINGER et al., 2001).

De acordo com as características do estroma, os osteossarcomas são classicamente classificados em osteoblástico, condroblástico e fibroblástico. O tipo osteoblástico, que representa cerca de 50% dos osteossarcomas, caracteriza-se por apresentar células malignas atípicas que produzem grande quantidade de osteóide. As células malignas usualmente são fusiformes, pequenas ou até mesmo com aparência epitelióide e raramente a matriz é madura e trabecular. O tipo condroblástico corresponde a 25% dos osteossarcomas e se caracteriza por apresentar predominantemente diferenciação condróide. As células cartilaginosas têm uma atipia pronunciada e são arranjadas em lóbulos. Na periferia dos lóbulos as células malignas se apresentam em camadas e usualmente há produção de osteóide. Ocasionalmente, a formação de osteóide ocorre nos centros dos lóbulos. O tipo fibroblástico caracteriza-se pela predominância e proliferação de células fusiformes malignas, se assemelhando ao fibrossarcoma. A produção de osteóide é mínima e focal, e representa cerca de 25% dos osteossarcomas em geral (UNNI & DAHLIN, 1989).

Existem outras classificações que incluem os tipos telangiectásico, de pequenas células, de células gigantes e justacortical (LANZKOWSKY, 2000). O osteossarcoma telangiectásico se apresenta histologicamente semelhante ao cisto ósseo aneurismático, com espaços contendo células gigantes benignas separados por septos. Entretanto, esses septos contêm células atípicas. Não se sabe se o prognóstico nesse tipo de osteossarcoma é diferente do convencional. No entanto, é importante reconhecê-lo por suas características peculiares (UNNI & DAHLIN, 1989).

O osteossarcoma justacortical divide-se em parosteal e periosteal. O parosteal foi o primeiro osteossarcoma justacortical, ou de superfície, a ser reconhecido como uma entidade específica (GESCHICKTER & COPELAND, 1951). Ocorre em pacientes adultos jovens, principalmente em mulheres, sendo 80% dos casos na distal do fêmur. O osteossarcoma parosteal deve ser distinguido de lesões benignas que podem se localizar na região justacortical como o osteocondroma e a miosite ossificante (NEWLAND & AYALA, 1977). O osteossarcoma do tipo periosteal é menos comum que o parosteal com moderada diferenciação histológica e apresenta predomínio do componente condroblástico. Frequentemente a matriz óssea está presente no centro dos lóbulos de cartilagem (UNNI & DAHLIN, 1989).

Na região de cabeça e pescoço, o tipo condroblástico tem sido descrito como predominante (CLARK et al., 1983; VEGE et al., 1991; DELGADO et al., 1994). No entanto, no estudo de 52 casos no Japão, TANZAWA et al. (1991) observaram predominância do tipo osteoblástico (57,7%).

Já em osteossarcomas que afetam ossos longos, o tipo osteoblástico é predominante. LEONARDO et al. (1997) observaram predominância do subtipo osteoblástico (53%), seguido pelo subtipo condroblástico (17%).

De acordo com o grau de malignidade, os osteossarcomas podem ser classificados em alto, intermediário e baixo grau. CLARK et al. (1983) relataram que a maioria dos tumores na região de cabeça e pescoço (56%) eram de alto grau de malignidade. MARDINGER et al. (2001) também observaram predominância dos osteossarcomas de alto grau (79%), assim como BERTONI et al. (1991), AUGUST et al. (1997) e HA et al. (1999), que mostraram uma relação de 9:1 entre os osteossarcomas da região craniofacial de alto e de baixo grau de malignidade. Em comparação com osteossarcomas de ossos longos, os de cabeça e pescoço não apresentam diferenças quanto ao grau de malignidade da doença (SLOOTWEG & MULLER, 1985).

Osteossarcomas intra-ósseos de baixo grau de malignidade são raros, sendo freqüentemente diagnosticados como neoplasias benignas, sendo a displasia fibrosa a mais comum (RAUBENHAIMER & NOFFKE, 1998). Os pacientes acometidos por osteossarcomas de baixo grau são geralmente adultos jovens. Radiograficamente apresenta características de uma lesão benigna, sendo geralmente radiolúcido com trabéculas ósseas radiopacas. Microscopicamente pode se observar uma pequena proliferação de células fusiformes apresentando mínima atipia e raras figuras de mitose. O tumor é distinguido de uma lesão fibro-óssea benigna pela presença de invasão da medula óssea e de tecidos moles extra-ósseos (UNNI & DAHLIN, 1989).

Existem poucos métodos que podem ser utilizados nos cortes histológicos para auxiliar no diagnóstico de um osteossarcoma, tentando diferenciá-lo de outros sarcomas ou de lesões fibro-ósseas benignas. Tem sido sugerido que as proteínas da matriz óssea possam auxiliar na diferenciação do osteossarcoma de outros sarcomas. A osteocalcina por exemplo, é uma proteína específica do tecido ósseo que pode ser utilizada para a diferenciação entre osteossarcoma e fibrohistiocitoma maligno. Tanto a osteonectina quanto

o colágeno tipo I podem ser encontrados em tumores formadores de tecido ósseo, no entanto essas proteínas não são específicas de tecidos malignos (UEDA & NAKANISHI, 1989). Recentemente o cbfa 1 (DUCY et al., 1997), um gene que codifica um promotor intranuclear da osteocalcina, tem sido identificado como sendo específico em células com linhagem osteoblástica e pode ter um papel no diagnóstico do osteossarcoma, podendo diferenciá-lo de outros sarcomas (BENNETT et al., 2000).

2.6. Tratamento

O tratamento do paciente com osteossarcomas de cabeça e pescoço requer uma equipe multidisciplinar incluindo cirurgião de cabeça e pescoço, patologista, oncologista, oftalmologista, neurocirurgião, radioterapeuta, cirurgião plástico, cirurgião-dentista, nutricionista, fisioterapeuta, terapeuta ocupacional entre outros (TRAN et al., 1992). A principal forma de tratamento para esse tipo de tumor é a ressecção cirúrgica. A quimioterapia e a radioterapia também são freqüentemente empregadas em associação com a cirurgia para o tratamento desses tumores.

2.6.1. Cirurgia

É o tratamento de escolha tanto para os osteossarcomas intramedulares quanto para os justacorticais (KRAGH et al., 1958; GARRINGTON et al., 1967; FU & PERZIN, 1974; CRAFT, 1992). Ressecção cirúrgica radical com margens adequadas é necessária porque freqüentemente há extensão do tumor para dentro do trabeculado ósseo além das margens radiográficas.

Devido às características anatômicas, a cirurgia para a remoção completa de tumores na região de cabeça e pescoço é complicada (ODA et al., 1997). Para os tumores maxilares, o tratamento é a maxilectomia radical com preservação do assoalho da órbita se possível. Na mandíbula, a hemimandibulectomia é o tratamento de escolha. Análise intraoperatória das margens cirúrgicas pela técnica do congelamento pode contribuir para a remoção completa dos tumores. O esvaziamento cervical normalmente não é realizado de forma eletiva, sendo indicado em casos com comprometimento linfonodal (RUSS & JESSE, 1980).

2.6.2. Quimioterapia

Com base na alta prevalência de metástases subclínicas em osteossarcomas de ossos longos, a quimioterapia foi introduzida, tendo um impacto positivo no prognóstico desses pacientes. JAFFE et al. em 1977 relataram bons resultados administrando altas doses de metotrexato em pacientes com osteossarcomas de ossos longos. Desde então, a quimioterapia se tornou uma terapêutica adjuvante importante no tratamento desse tipo de tumor. Além do metotrexato, outras drogas como a doxorrubicina, cisplatina e ifosfamida estão sendo incorporadas para o tratamento desse tipo de tumor (WHELAN, 1997).

A sobrevida em 5 anos para pacientes tratados apenas com cirurgia era de 15%, e aumentou para 60% a 80% em pacientes tratados com cirurgia e quimioterapia (GOORIN et al., 1985; ELIBER & ROSEN, 1989; PRATT et al., 1990). Utilizando a quimioterapia pré e pós-cirúrgica combinada com a cirurgia radical, ROSEN et al. (1982) relataram 93% de sobrevida em 20 meses em osteossarcomas de ossos longos. A quimioterapia pré-operatória promove uma redução no tumor por necrose, o que favorece a remoção cirúrgica total (SMEELE et al., 1997).

Em osteossarcomas da região craniofacial a quimioterapia também vem sendo utilizada, no entanto, os resultados não são claros. Em um estudo retrospectivo, RAYMOND et al. (1989) relataram uma porcentagem de sobrevida em 5 anos de 33% em pacientes tratados com cirurgia e quimioterapia e de 41% em pacientes tratados apenas com cirurgia. Essa diferença, no entanto, não foi estatisticamente significativa. Vários autores têm reportado que a quimioterapia juntamente com a cirurgia não tem promovido mudanças significativas no prognóstico (RAYMOND et al., 1989; BERTONI et al., 1991; KASSIR et al., 1997). Por outro lado, SMEELE et al. (1997), relataram que a quimioterapia melhorou a taxa de sobrevida dos pacientes com osteossarcomas craniofaciais.

2.6.3. Radioterapia

Os osteossarcomas são relativamente radorresistentes, necessitando de doses acima de 6000 cGy para ter algum efeito (HUVOS, 1991). De um modo geral, a radioterapia tem sido utilizada para os casos de tumores residuais, recorrências e para os tumores considerados inoperáveis (FORTEZA et al., 1986). CHAMBERS & MAHONEY (1970), relataram bons resultados utilizando altas doses de radiação (10.000 – 16.000 cGy) seguido de remoção cirúrgica radical. No entanto, muitos outros autores mostraram que a radioterapia foi ineficaz no tratamento de osteossarcomas dos maxilares (LINDQVIST et al., 1986; MARK et al., 1991; TANZAWA et al., 1991; SMEELE et al., 1997). DELGADO et al. (1994) mostraram que quando as margens de uma cirurgia não são consideradas livres da doença, o uso de radioterapia não melhora o prognóstico do paciente. A radioterapia é mais freqüentemente utilizada em osteossarcomas da região de cabeça e pescoço do que em ossos longos, particularmente em casos onde a remoção cirúrgica completa não é possível (ODA et al., 1997).

2.7. Recorrência Local

A principal complicação do osteossarcoma na região de cabeça e pescoço é a recorrência local, que ocorre em cerca de 33% a 69% dos pacientes (BERTONI et al., 1991). Os locais mais comuns de recorrência são a mandíbula (39% a 70%) e a maxila (13 a 53%) (CARON et al., 1971; RUSS & JESSE, 1980; VEGE et al., 1991).

Recorrência local e extensão intracraniana são as causas mais freqüentes de falhas no tratamento (KRAGH et al., 1958; FINKELSTEIN, 1970). A recorrência local de osteossarcomas da região de cabeça e pescoço é extremamente difícil de ser tratada e os pacientes afetados geralmente evoluem para óbito (DELGADO et al., 1994; GREENBERG et al., 1994). A maioria dos pacientes que morrem devido à recorrência local evoluem para óbito após cerca de 2 a 3 anos (CLARK et al., 1983).

2.8. Metástase

As metástases regionais e à distância de osteossarcomas da região de cabeça e pescoço são raras no momento do diagnóstico. Quando se desenvolve após o diagnóstico, ocorre, na maioria das vezes, após 18 a 24 meses (CARON et al., 1971; BATSAKIS, 1987; VEGE et al., 1991). Os principais locais de metástases à distância dos osteossarcomas são os pulmões, outros ossos e fígado (MARDINGER et al., 2001). Sendo assim, radiografias de tórax devem ser feitas periodicamente em pacientes que foram tratados de osteossarcoma, para verificar o possível desenvolvimento de metástase em pulmão (GORSKY & EPSTEIN, 1999). Metástases para linfonodos regionais são raras em osteossarcomas de cabeça e pescoço (RAYMOND et al., 1989; DELGADO et al., 1994).

BATSAKIS (1987) observou que 33% dos casos haviam sofrido metástase. Em outro estudo mais recente, MARDINGER et al. (2001) relataram que 18% dos casos de osteossarcomas de cabeça e pescoço publicados na literatura apresentaram metástase.

Por outro lado, em osteossarcomas de ossos longos as metástases são mais freqüentes e encontradas muitas vezes no momento do diagnóstico (FERRARI et al., 2001), ocorrendo principalmente nos pulmões. Alguns estudos relataram que mais de 80% dos pacientes com osteossarcomas de ossos longos apresentam metástases microscópicas subclínicas no momento do diagnóstico (BENJAMIN, 1989; ELIBER & ROSEN, 1989; DORFMAN & CZERNIAK, 1995). Poucos pacientes nos quais as metástases são detectadas nos estágios iniciais da doença podem ser curados (WHELAN, 1997).

2.9. Prognóstico

Acredita-se que os osteossarcomas de maxila e mandíbula se comportam diferentemente dos de ossos longos, tendo um melhor prognóstico (CLARK et al., 1983; DAHLIN, 1988; NICHOLSON, 1993). No entanto, novos trabalhos estudando um número maior de casos têm mostrado que a sobrevida a longo prazo é menor que 35%, devido principalmente à recorrência local (VAN ES et al., 1997). De acordo com o trabalho de REGEZI et al. (1987), a sobrevida de pacientes com osteossarcomas nos maxilares é de aproximadamente 40% em 5 anos, enquanto que em outros ossos é de 20%.

O tempo de sobrevida parece estar relacionado com vários fatores como local de origem do tumor primário, idade do paciente, desenvolvimento de recorrência local, presença ou não de metástases, presença de doenças pré-existentes e forma de tratamento. De acordo com o local acometido, estudos mostram um tempo de sobrevida maior em pacientes com lesões mandibulares quando comparados com pacientes com lesões na maxila (GARRINGTON et al., 1967; FU & PERZIN, 1974). Outros autores mostraram que a taxa de sobrevida em 5 anos variou de 24% a 50% em pacientes com lesões mandibulares e 19% a 30% em pacientes com tumores na maxila (KRAGH et al., 1958; GARRINGTON et al., 1967; FILKELSTEIN, 1970; CARON et al., 1971). A região de sínfise mandibular tem sido o local com melhor prognóstico e o antro maxilar o pior (GARRINGTON et al., 1967; CARON et al., 1971).

O prognóstico é melhor em pacientes jovens (VEGE et al., 1991; HUVOS, 1991; SMEELE et al., 1994; AUGUST et al., 1997), diagnosticados precocemente e tratados com cirurgia radical (DELGADO et al., 1994).

A principal causa de morte em pacientes com osteossarcoma de cabeça e pescoço é a recorrência local da doença (MARDINGER et al., 2001), além de extensão para a base do crânio e cérebro (FORTEZA et al., 1986). O prognóstico é bastante desfavorável em pacientes com ressecção incompleta da lesão ou recorrência local (RAYMOND et al., 1989; SMEELE et al., 1994; HA et al., 1999).

A presença de metástase à distância reduz a taxa de sobrevida a praticamente zero na maioria dos casos (BATSAKIS et al., 1980). Em casos de osteossarcomas associados à presença de doenças pré-existentes, como doença de Paget, a sobrevida é extremamente baixa (BATSAKIS et al., 1980).

Pacientes com osteossarcoma em região de cabeça e pescoço tratados com cirurgia radical apresentam média de 80% de sobrevida em 5 anos (RUSS & JESSE; 1980; CLARK et al., 1983; RYAN et al., 1986; SMEELE et al., 1994).

Segundo trabalhos de GARRINGTON et al. (1966) e DAHLIN & COVENTRY (1967), não há correlação entre o tipo histológico e o prognóstico da doença. No entanto, tumores do subtipo fibroblástico, em pacientes de 25 a 30 anos, parecem apresentar um prognóstico mais favorável (BENTZEN et al., 1988).

Devido ao pequeno número de casos relatados e a falta de uniformidade na classificação histológica dos osteossarcomas de cabeça e pescoço, a relação entre o grau de malignidade e o prognóstico permanece duvidosa (SLOOTWEG & MULLER, 1985). No entanto, tem sido relatado que tumores considerados de alto grau de malignidade exibem um prognóstico pior (CLARK et al., 1983; BERTONI et al., 1991; HA et al., 1999).

Os tumores justacorticais também parecem apresentar um prognóstico melhor que os intramedulares (OKADA et al., 1999).

2.10. Marcadores Moleculares

O desenvolvimento e a progressão de neoplasias malignas em humanos são caracterizados pelo acúmulo de alterações genéticas. As investigações dessas alterações são importantes para entender os mecanismos de oncogênese, avaliar o comportamento biológico, e consequentemente aperfeiçoar terapêuticas favorecendo o prognóstico (LOPES et al., 2001).

Alterações em genes envolvidos no controle do ciclo celular têm sido associadas na patogênese de muitos tipos de tumor, incluindo os sarcomas (CORDON-CARDO, 1995; HALL&PETERS, 1996). O gene mais estudado e mais freqüentemente relacionado à neoplasias malignas é o p53 (NIGRO et al., 1989).

Além do p53, genes localizados no braço longo do cromossomo 12 têm sido encontrados alterados em diferentes tumores, incluindo os osteossarcomas (WUNDER et al., 1999). Os genes MDM2 (murine double minute 2) e o CDK4 (cyclin dependent kinase 4) encontram-se nessa região (OLINER et al., 1992; LEACH et al., 1993; MATSUSHIME et al., 1994).

Assim como oncogenes e genes supressores de tumor, outros marcadores podem ser utilizados para avaliar o comportamento de tumores. Estudos têm revelado que a atividade celular proliferativa pode estar fortemente associada com o comportamento biológico de vários tumores (QUINN & WRIGHT, 1990). Esta atividade proliferativa pode ser analisada a partir da reação de imunohistoquímica com anticorpos para PCNA e Ki67 (NAWA et al., 1996).

2.10.1. P53

O P53 é um gene supressor de tumor localizado no braço curto do cromossomo 17. A proteína codificada por esse gene, também chamada de p53, consiste em 393 aminoácidos compreendendo quatro regiões com diferentes funções (NYLANDER et al., 2000).

O P53 atua como um "policial molecular" que impede a propagação das células geneticamente danificadas (LEVINE, 1997). Pode ser ativado por diferentes situações estressantes na qual a célula pode passar, como por exemplo, danos no DNA e irradiação ultravioleta (NYLANDER et al., 2000). Uma vez ativada, a proteína p53 conduz a ativação de outros genes para a produção de outras proteínas. O p53 ativado induz a interrupção do ciclo celular na fase G1, causada pela transcrição do inibidor da CDK (cyclin dependent kinase) p21. O p21 inibe os complexos ciclina/CDK e, assim, impede a fosforilação da proteína Rb necessária para a entrada das células na fase S. Essa pausa no ciclo celular é necessária para o reparo do DNA, feito pela proteína GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage), que também é ativada pela p53. Se o reparo for bem sucedido, a p53 ativa o gene MDM2, cuja função está relacionada com a inativação da p53, com conseqüente liberação do ciclo celular. Se o reparo não for bem sucedido, a p53 induz a ativação de genes indutores da apoptose, como o bax e o IGF-BP3. Quando o P53 sofre mutação ou está ausente, as células prosseguem com a replicação do DNA danificado, o que resultará em mais mutações, rearranjo dos cromossomos e aneuploidia (MOLL & SCHRAMM, 1998).

A proteína p53 tem uma vida média curta e portanto difícil de ser detectada em tecidos normais. Entretanto, em casos de mutação, defeito na degradação ou por ligação à outras proteínas, pode permanecer em alguns tecidos por um período longo de tempo (NYLANDER et al., 2000). A detecção da p53 através de imunohistoquímica, tem sido

correlacionada com a sua mutação (BAAS et al., 1994), devido a um aumento na vida média da proteína mutada (FINLAY et al., 1988). No entanto, os anticorpos utilizados para análises de materiais parafinados reconhecem tanto a proteína do p53 normal quanto a mutada, não havendo meios de distinguí-las (NYLANDER et al., 2000). A presença da proteína detectável é geralmente considerada como indicativa de proteína mutante, a despeito do mecanismo de estabilização envolvido (MURTI et al., 1998).

O tipo de mutação mais comum no P53 é a missense, onde a mudança em uma ou mais bases de um códon resultam na transcrição de aminoácidos diferentes, constituindo 79% de todas as mutações (GREENBLATT et al., 1994). Diferentes tipos de tumores apresentam mutações nos chamados “hot spots”, ou pontos quentes, onde a maioria das mutações acontecem (NYLANDER et al., 2000).

Diferentes mutações alteram diferentes propriedades do P53, podendo alterar a estrutura da proteína. Nem todas as mutações causam perda da função normal, e para o P53 ainda é incerta a função de genes mutantes na biologia tumoral (PRIVES & HALL, 1999). Mais de 50% dos tumores humanos apresentam mutações nesse gene. A perda homozigótica do gene P53 é encontrada em praticamente qualquer tipo de tumor maligno, como carcinomas de pulmão, cólon, mama e sarcomas (LEVINE, 1992; PORTER et al., 1992).

Vários estudos evidenciaram a importância do gene P53 na patogênese de osteossarcomas, e a frequência de alterações desse gene nesse tipo de tumor varia de 20% a 60% (MILLER et al., 1990; TOGUCHIDA et al., 1992; UEDA et al., 1993; WADAYAMA et al., 1993; MOUSSES et al., 1996). Entretanto, esses estudos ainda não conseguiram estabelecer uma relação entre as alterações do P53 e o prognóstico da doença.

Em estudo com osteossarcomas de ossos longos, LEONARDO et al. (1997) mostraram que 26,5% (22 de 83 dos casos) apresentaram positividade para p53, número este similar à outros estudos (WADAYAMA et al., 1993; MOUSSES et al., 1996). Neste mesmo trabalho, os casos positivos para p53 foram encontrados principalmente em pacientes mais velhos (média de 40 anos) que os casos negativos (média de 28 anos). Notou-se também que não houve diferenças significativas entre a positividade para p53 e o subtipo histológico ou se o tumor era primário ou se era uma metástase.

Estudando osteossarcomas de cabeça e pescoço, LOPES et al. (2001) encontraram positividade imunohistoquímica para p53 em 88,8% dos casos, e OLIVEIRA et al. (1997) em 47,5%.

Além dos osteossarcomas, mutações no gene P53 têm sido identificadas em outras neoplasias mesenquimais, incluindo 30% a 60% dos fibrohistiocitomas malignos, lipossarcomas e rabdomiossarcomas (WADAYAMA, et al., 1993; KAWAI et al., 1994). Esses estudos mostraram também que a expressão imunohistoquímica da p53 estava associada com tumores de alto grau de malignidade e de comportamento agressivo. BOSARI et al. (1995) também associaram a superexpressão da p53 com tumores histologicamente indiferenciados e de prognóstico desfavorável.

Osteossarcoma pode ocorrer em pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni, que está associada com a presença de um alelo P53 mutante (MALKIN et al., 1990). Estudos com camundongos transgênicos deficientes em P53 (DONEHOWER et al., 1992) ou que expressavam alelos P53 mutados (LAVIGUEUR et al., 1989) mostraram um aumento na incidência de osteossarcomas.

2.10.2. MDM2

O gene MDM2 localizado no braço longo do cromossomo 12 apareceu como um novo tipo de proto-oncogene devido a sua habilidade de neutralizar a atividade de genes supressores de tumor (JONES et al., 1996). O principal alvo do MDM2 é o p53, que é encontrado mutado em mais de 50% de todos os tumores humanos (HOLLSTEIN et al., 1991). O gene MDM2 codifica uma proteína que tem a capacidade de se ligar tanto à proteína do p53 quanto à proteína de outro gene supressor de tumor, o retinoblastoma (Rb) (MOMAND et al., 1992; XIAO et al., 1995). O MDM2 é ativado exatamente pelo p53, e a sua proteína tem a capacidade de se ligar a ele bloqueando a sua atividade de transcrição. A ligação entre as proteínas MDM2 e p53 é responsável também pela saída do p53 do núcleo para o citoplasma, onde ela é degradada (NYLANDER et al., 2000).

O gene MDM2 tem sido encontrado amplificado em sarcomas, incluindo o osteossarcoma (OLINER et al., 1992; LANDANYI et al., 1993; NAKAYAMA et al., 1996). Outros tumores com freqüente amplificação do gene MDM2 são os astrocitomas e os tumores do esôfago (MOMAND & ZAMBETTI, 1997). Tem sido sugerido que a amplificação e superexpressão do MDM2 podem ter efeitos similares às mutações no p53 (LEONARDO et al., 1997).

Na maioria dos casos, a amplificação do gene MDM2 é acompanhada pela superexpressão de sua proteína (LEACH et al., 1993; MARCHETTI et al., 1995). Mas em alguns casos pode ser observada superexpressão sem amplificação (McCANN et al., 1995). LEONARDO et al. (1997) observaram amplificação do MDM2 em apenas 6,6% em 83 casos de osteossarcomas. Já LOPES et al. (2001), encontraram expressão da proteína em 55% dos casos de osteossarcomas de cabeça e pescoço, através de imunohistoquímica, e amplificação em 66% dos casos.

Interessante que alterações no MDM2 e p53 normalmente não coexistem sugerindo que amplificação do MDM2 pode ser uma alternativa para a mutação no p53 durante a gênese dos tumores e progressão dos sarcomas (MOMAND et al., 1992; OLINER et al., 1992; LEACH et al., 1993; MELTZER, 1994)

Apesar de raras, as mutações do p53 juntamente com a superexpressão do MDM2 são observadas em alguns casos (PIETTE et al., 1997). Em um estudo de 104 carcinomas humanos, 12 tumores apresentaram mutação no p53, 10 apresentaram superexpressão ou amplificação do MDM2 e apenas 1 caso apresentou tanto mutação no p53 quanto superexpressão do MDM2 (FLORENES et al., 1994). LOPES et al. (2001) também observaram positividade imunohistoquímica simultânea para p53 e MDM2 em 55% dos casos.

Em um estudo de sarcomas de tecidos moles, os casos onde a mutação no p53 ocorreu concomitante com a superexpressão do MDM2, apresentaram um prognóstico pior (CORDON-CARDO et al., 1994).

A amplificação do gene MDM2 tem sido associada com recorrência ou metástase de osteossarcomas em alguns estudos (LANDANYI et al., 1993). Além da alteração em osteossarcomas metastáticos, o MDM2 têm sido encontrado amplificado em osteossarcomas do tipo parosteal.

2.10.3. CDK4

A regulação do ciclo celular em todos os eucariontes é feita através das ciclinas e suas subunidades, as CDKs (cyclin dependent kinase) (PAGANO et al., 1992), formando um complexo que consiste em três diferentes proteínas, a ciclina D e duas quinases dependente de ciclina: a CDK4 e a CDK6. Há também os inibidores dessas CDKs, as CKIs (cyclin dependent kinase inhibitors), dentre elas a p16, que se liga ao CDK4 e ao CDK6, inibindo a sua associação com a ciclina D (NYLANDER et al., 2000).

A CDK4 é considerada uma das moléculas mais importantes no ciclo celular. A sua função é a fosforilação e inativação da proteína do retinoblastoma (Rb) em associação com a ciclina D (MATSUSHIME et al., 1994). A proteína Rb ativa regula a saída da célula da fase G1. Desta forma, a função do CDK4 deve ser considerada como a de ativar o ciclo celular através da inativação da proteína Rb (EWEN et al., 1993; KATO et al., 1993; MATSUSHIME et al., 1994; KANOE et al., 1998).

Sendo o CDK4 o responsável pela fosforilação e inativação da proteína do gene supressor de tumor do retinoblastoma (pRb), que lidera a célula na progressão do ciclo celular, alterações no CDK4 podem resultar na perda de controle dos sinais regulatórios do ciclo celular normal, resultando numa proliferação celular desordenada (KANOE et al., 1998).

A amplificação e superexpressão do CDK4 têm sido relacionados com anormalidades no controle celular de gliomas e alguns sarcomas (LANDANYI et al., 1995; MAELANDSMO et al., 1995). Em tumores malignos de células da glia, a maioria dos tumores com amplificação do gene CDK4 foram encontrados expressando a proteína Rb, indicando que a amplificação do CDK4 é uma alternativa para a mutação do gene Rb (HE et al., 1995).

LOPES et al. (2001), estudando osteossarcomas de cabeça e pescoço, encontraram expressão da proteína CDK4 em 88,8% dos casos, através de imunohistoquímica, e amplificação em 66,6% dos casos. GAMBERI et al. (2000) encontraram a proteína CDK4 expressa em 92% dos casos, estudando osteossarcomas do tipo parosteal. Por outro lado, KANOE et al. (1998), relataram que apenas 10,7% dos osteossarcomas apresentaram amplificação do CDK4.

2.10.4. PCNA

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear ácida não-histônica de 36 kDa, que foi inicialmente isolada a partir do soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (MIYACHI et al., 1978). O PCNA é essencial na síntese de DNA, atuando como auxiliar da DNA polimerase delta, estando presente principalmente no final de G1 e na fase S do ciclo celular (HUANG et al., 1994).

Além de estar relacionado à proliferação, o PCNA pode estar envolvido em processos de reparo do DNA ou representar indução por fatores de crescimento (McCORMICK & HALL, 1992). Muitas evidências mostram a importância do PCNA no processo de reparo do DNA. Têm sido relatado que se nas células irradiadas com raios UV, as reações de reparo do DNA ocorrem no núcleo com um acúmulo de PCNA, mesmo se as células não se apresentarem na fase S do ciclo celular (TOSCHI & BRAVO, 1988).

O PCNA é expresso em quantidades diferentes durante o ciclo celular e apresenta sua taxa de síntese diretamente relacionada com o índice de células em proliferação. O aumento da atividade proliferativa é um importante indicador da agressividade de lesões malignas (GOMES et al., 2000). PARK & PARK (1995) encontraram alta positividade imunohistoquímica para PCNA em 35,3% de 34 casos de osteossarcomas, sendo mais

freqüente no subtipo fibroblástico. CHANO et al. (1996), observaram uma maior positividade para PCNA em áreas osteoblásticas em comparação com as áreas condroblásticas dos osteossarcomas.

2.10.5. Ki-67

O Ki-67 é um antígeno presente somente em células em proliferação, e ausente em células quiescentes (GERDES et al., 1984). Uma análise detalhada do ciclo celular revelou que células, em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), foram positivas para Ki-67, enquanto que células em G0 não expressaram este antígeno (GERDES et al., 1984).

Com ajuda de anticorpos monoclonais contra o antígeno Ki-67, pôde-se determinar a fração de crescimento de uma população de células através de métodos imunohistoquímicos (BROWN & GATTER, 1990). Uma correlação significativamente alta entre o Ki-67 e características histopatológicas de malignidade têm sido relatados (ZHU et al., 1999). PARK & PARK (1995) observaram apenas positividade fraca (menos de 10% das células tumorais marcadas) para o Ki-67 através de imunohistoquímica, em 64,7% dos casos de osteossarcomas.

3. Proposição

O objetivo desse trabalho foi avaliar as características clínicas, histopatológicas e a expressão imunohistoquímica das proteínas p53, MDM2, CDK4, PCNA e Ki67, em osteossarcomas de cabeça e pescoço, verificando possíveis fatores associados ao prognóstico.

4. Material e Métodos

No período de 1954 a 2000 foram admitidos para tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer – A.C. Camargo, São Paulo, aproximadamente 50.000 pacientes. Levantamentos preliminares mostraram que cerca de 35 pacientes apresentaram osteossarcomas. Após revisão das lâminas dos casos, 10 casos foram excluídos ou por não conterem material suficiente para a realização das reações de imunohistoquímica ou por não poderem ser classificados como osteossarcomas.

As informações referentes a idade, gênero, tempo de queixa, tratamentos prévios, tamanho clínico do tumor, localização, tipo de tratamento realizado, recorrência, metástase e situação clínica na última avaliação foram sumarizados das fichas clínicas através de um questionário padronizado (Anexo 1).

A análise histopatológica e imunohistoquímica foram realizadas em peças cirúrgicas. Quando o paciente não havia sido tratado por cirurgia, essas análises foram realizadas em material obtido na biópsia.

4.1. Análise Histopatológica

Foram realizados cortes de 5 μ m de espessura dos tecidos emblocados em parafina para a confecção de lâminas, as quais foram coradas com H&E (hematoxilina e eosina). Essas lâminas foram, então, revisadas para a confirmação do diagnóstico e classificação quanto ao tipo histológico: osteoblástico, condroblástico e fibroblástico, e quanto ao grau de malignidade: alto, intermediário e baixo.

Essa classificação foi realizada por 3 pessoas separadamente e os casos em que não houve concordância, foram reanalisados pelas mesmas 3 pessoas até chegar em um consenso.

4.2. Imunohistoquímica

Para a realização da reação de imunohistoquímica, foram realizados cortes de 3µm de espessura dos tecidos incluídos em parafina e montados em lâminas de vidro. Os cortes foram desparafinados em duas trocas de xilol: 30 minutos em estufa a 56°C e 20 minutos em temperatura ambiente. A seguir os cortes foram hidratados em soluções decrescentes de álcool (100%, 90%, 70% e 50%) por 1 minuto em cada solução e posteriormente lavados em água corrente por 30 segundos.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3% (10 volumes) em 5 trocas de 5 minutos cada. Os cortes foram, então, lavados em água corrente por 30 segundos.

O procedimento de recuperação antigênica foi realizado colocando os cortes em um recipiente com solução de ácido cítrico (pH 6,0) que foram levados ao forno de microondas (Panasonic – modelo NN7809BH) em potência alta (consumo de energia – 1380 W) por dois ciclos de 12 minutos cada. Após 2 horas em temperatura ambiente, tempo necessário para que ocorresse o resfriamento do líquido, os cortes foram lavados com solução fosfatada tamponada (PBS: phosphate-buffered saline) e incubados por 12 horas com os seguintes anticorpos primários monoclonais:

- MDM2 (Santa Cruz Biotechnology SMP14, sc-965) 1:400
- CDK4 (Santa Cruz Biotechnology C-22 sc-260-G) 1:400

- P53 (Dako, DO-7) 1:200.
- PCNA (Dako, PC-10) 1:16000
- Ki-67 (Dako, MIB-1) 1:200.

Após as 12 horas os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário (StreptABComplex/HRP - Dako, 1/500) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente os cortes foram incubados com o complexo Streptoavidina – Biotina (StreptABComplex/HRP - Dako, 1/500) por mais 30 minutos. A reação foi evidenciada com diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos e os cortes contra-corados com hematoxilina de Carazzi também por 5 minutos.

A positividade da reação foi classificada segundo a porcentagem de núcleos de células tumorais marcadas, não levando em consideração a intensidade. Desta forma consideramos:

- - (negativo: positividade entre 0 e 5% das células tumorais)
- + (positivo fraco: entre 5% e 25% das células tumorais)
- ++ (positivo moderado: entre 25% e 50% das células tumorais)
- +++ (positivo forte: mais que 50% das células tumorais)

4.3. Análise Estatística

4.3.1 - Correlação de Frequência

A análise de correlações entre as diversas variáveis estudadas foi realizada empregando-se o teste do qui-quadrado em tabelas de contingência de dupla entrada. Análises realizadas em tabelas 2 X 2 (cotejamento de pares de variáveis dicotômicas) foram sempre elaboradas sem correlação de continuidade para o valor de qui-quadrado obtido. Quando necessário, devido frequências esperadas menores do que cinco ou ao pequeno número da amostra realizada, o teste do qui-quadrado foi substituído pelo teste exato de Fisher com o intuito de evitarem-se distorções da significância estatística.

4.3.2 - Sobrevida Global

A sobrevida global, a qual corresponde ao tempo decorrido entre a data do início do tratamento e o óbito do paciente ou o tempo entre o início do tratamento e a última informação objetiva, foi realizada através do método de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas de sobrevida global de acordo com as variáveis estudadas (informações clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas) foi realizada através do teste estatístico log-rank.

5. Resultados

Foram selecionados 25 casos de osteossarcomas da região de cabeça e pescoço atendidos no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo – São Paulo. Dos 25 casos analisados, 24 eram tumores primários e 1 caso se tratava de uma recorrência local de um tumor na mesma região que havia sido tratado com a associação de cirurgia com quimioterapia.

5.1. Características Clínicas e Epidemiológicas

Dentre os 25 pacientes analisados, 12 (48%) eram do gênero masculino e 13 (52%) do gênero feminino (Tabela 1 e Gráfico 1). A idade dos pacientes no momento do diagnóstico variou de 9 a 66 anos, com uma média de 29 anos. A maioria dos pacientes estava entre 21 e 30 anos (9 casos – 36%) e 28% entre 11 e 20 anos (Tabela 2 e Gráfico 2). Apenas 1 paciente tinha menos de 10 anos e 5 (20%) mais de 40 anos.

O período médio entre o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas causado pelo tumor e a consulta inicial foi de 10,24 meses, variando de 1 a 72 meses. O local mais acometido foi a mandíbula com 15 casos (60%), seguido pela maxila com 9 casos (36%). Em apenas 1 caso (4%) o tumor não estava localizado na mandíbula ou maxila, e encontrava-se na coluna cervical entre as vértebras C II e C IV (Tabela 3 e Gráfico 3). O tamanho do tumor primário variou de 3 até 15 cm, com uma média de 6,81 cm. No entanto, a maioria dos tumores (44%) se encontravam entre 6 a 10 cm no momento do diagnóstico. Oito casos (32%) eram menores que 5 cm e 6 (24%) maiores que 10 cm (Tabela 4 e Gráfico 4).

Dentre os 25 pacientes analisados, 3 apresentaram história prévia de radioterapia anterior para o tratamento de outras doenças. O primeiro paciente recebeu dose total de 4.600 cGy para o tratamento de um rabdomiossarcoma na região de nasofaringe, cerca de 7 anos antes do aparecimento do osteossarcoma em maxila. O segundo paciente recebeu dose total de 3.000 cGy para o tratamento de um mieloma múltiplo, cerca de 10 anos antes do desenvolvimento do osteossarcoma na região de mandíbula. O terceiro paciente foi tratado com 5.000 cGy por apresentar um linfangioma localizado na face em 1976 e em 2001, 25 anos após o tratamento radioterápico, desenvolveu um osteossarcoma na mandíbula. O período médio entre a realização da radioterapia e o desenvolvimento do osteossarcoma nesses 3 pacientes foi de 14 anos.

Tabela 1. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com o gênero.

Gênero	Número de pacientes	(%)
Masculino	12	48
Feminino	13	52
TOTAL	25	100

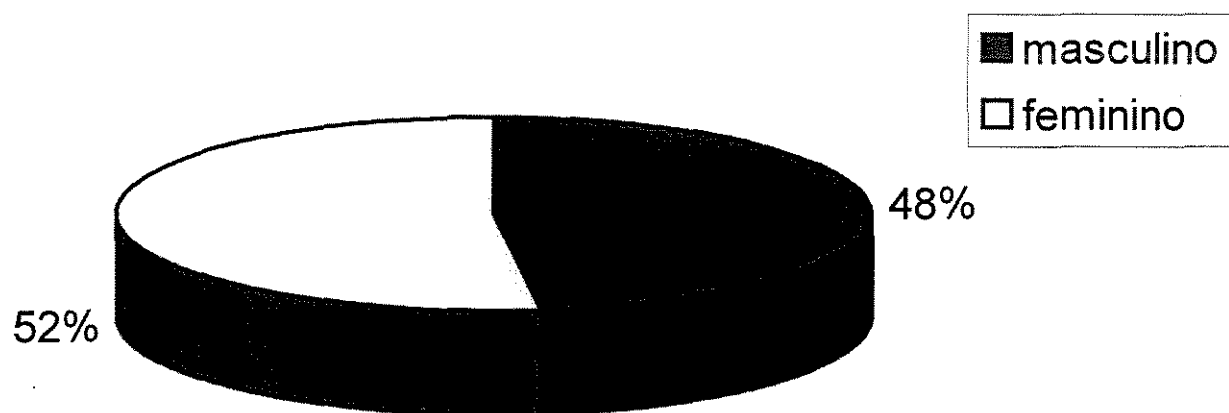


Gráfico 1. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com o gênero.

Tabela 2. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com a faixa etária

Faixa etária (anos)	Número de pacientes	(%)
0 — 10	1	4
10 — 20	7	28
20 — 30	9	36
30 — 40	3	12
40 — 50	1	4
50 — 60	1	4
60 — 70	3	12
TOTAL	25	100

Número de
pacientes

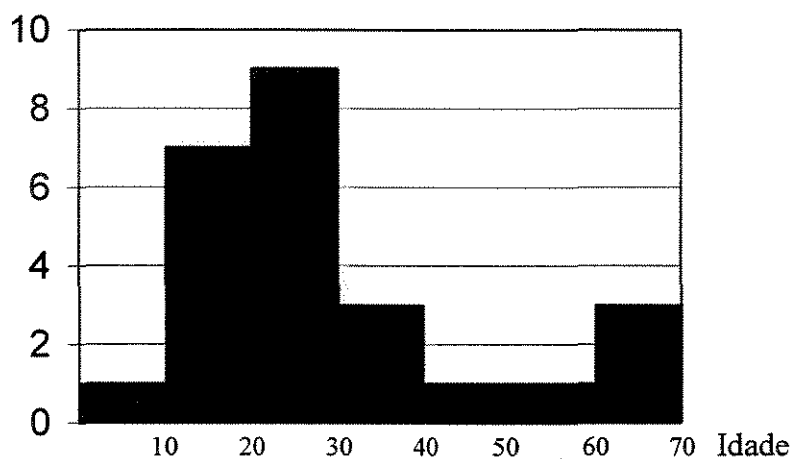


Gráfico 2. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com a faixa etária.

Tabela 3. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com a localização.

Localização	Número de pacientes	(%)
Mandíbula	15	60
Maxila	9	36
Outros	1	4
TOTAL	25	100

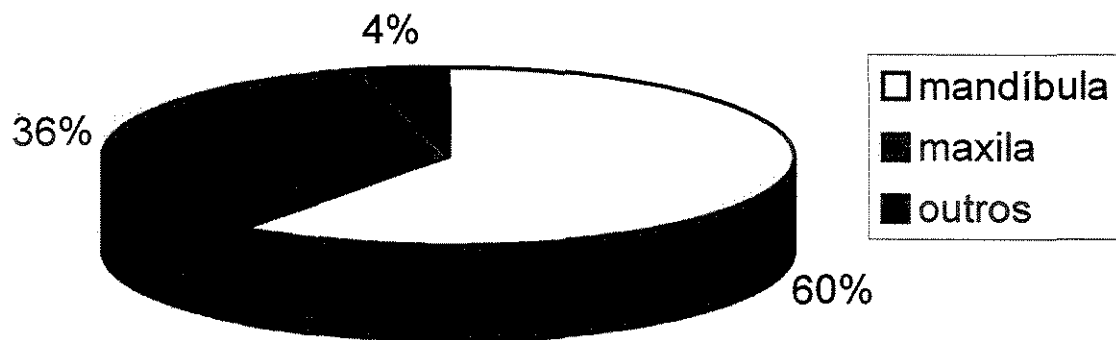


Gráfico 3. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com a localização.

Tabela 4. Frequência dos osteossarcomas de acordo com o tamanho clínico do tumor (cm).

Tamanho clínico do tumor (cm)	Número de pacientes	(%)
0 — 5	8	32
5 — 10	11	44
10 — 15	6	24
TOTAL	25	100

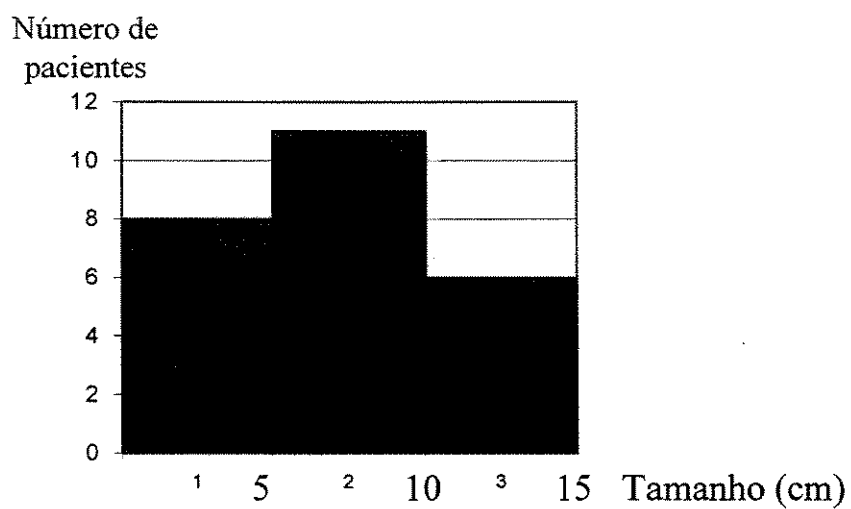


Gráfico 4. Frequência dos osteossarcomas de acordo com o tamanho clínico do tumor (cm).

5.2. Características Histopatológicas

Microscopicamente pudemos observar em todos os tumores a presença de um estroma maligno com a formação de osteóide. Alguns tecidos sofreram descalcificação, não comprometendo, no entanto, a análise histopatológica.

Dezoito casos (72%) foram classificados como condroblástico e 7 (28%) como osteoblástico (Tabela 5 e Gráfico 5). Os casos classificados como condroblástico apresentaram microscopicamente a formação de lóbulos de cartilagem maligna com a periferia apresentando maior celularidade e formação de material osteóide (Figuras 1 e 2). Em alguns casos o tecido cartilaginoso estava permeando o tecido ósseo, não havendo limites distintos entre as duas estruturas. Os tumores do tipo osteoblástico eram compostos por áreas de osso imaturo e osteóide separados por um estroma fibroso celularizado (Figuras 3 e 4).

De acordo com o grau de malignidade, 13 casos (52%), foram classificados como de grau intermediário. Onze casos foram classificados como de alto grau, representando 44% do total e apenas 1 caso foi classificado como de baixo grau (Tabela 5 e Gráfico 6). O tumor de baixo grau apresentava células com pouca atipia e raras figuras de mitose (Figura 5). Os de grau intermediário já se apresentavam mais celularizados e com figuras de mitose mais frequentes (Figura 6). Os tumores de alto grau apresentavam alta celularidade, mitoses atípicas e células com pleomorfismo acentuado (Figuras 7 e 8).

Os casos em que os pacientes tinham história de radioterapia prévia apresentaram características histopatológicas semelhantes aos demais, sendo que dois casos eram do tipo osteoblástico e um do tipo condroblástico. Além disso, dois eram de grau de malignidade intermediário e um de alto grau.

Tabela 5. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com o tipo histológico e grau de malignidade.

Variáveis	Número de pacientes	(%)
Tipo Histológico		
Osteoblástico	7	28
Condroblástico	18	72
Fibroblástico	0	0
Grau de Malignidade		
Baixo	1	4
Intermediário	13	52
Alto	11	44
TOTAL	25	100

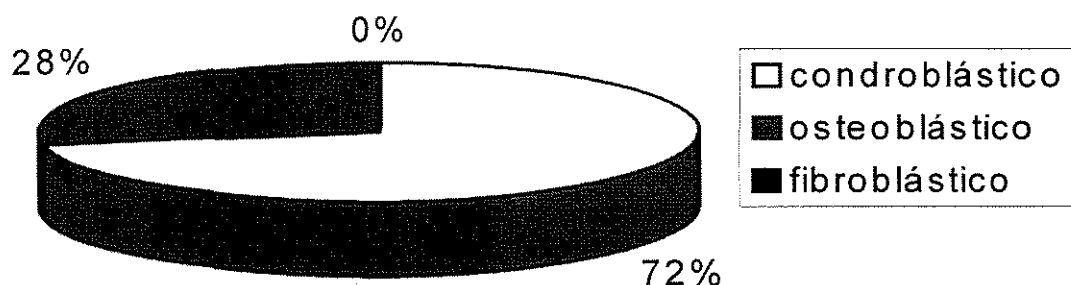


Gráfico 5. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com o tipo histológico.

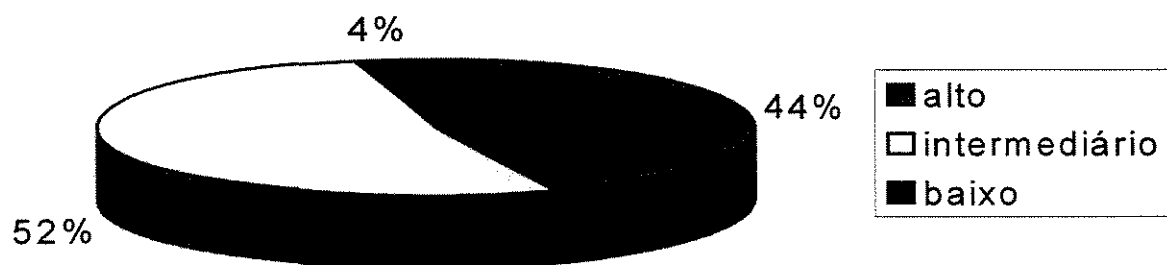


Gráfico 6. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com o grau de malignidade.

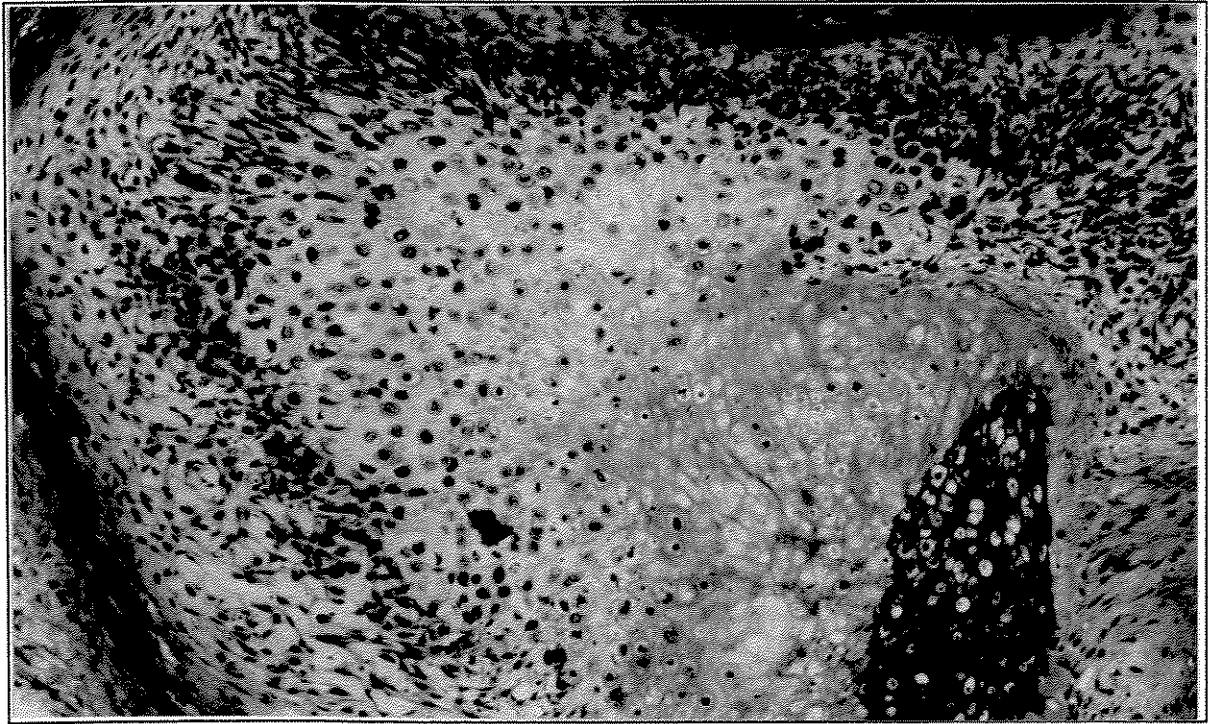


Figura 1. Osteossarcoma do tipo condroblástico mostrando lóbulos de cartilagem maligna com grande celularidade na periferia. (H&E – 100X)

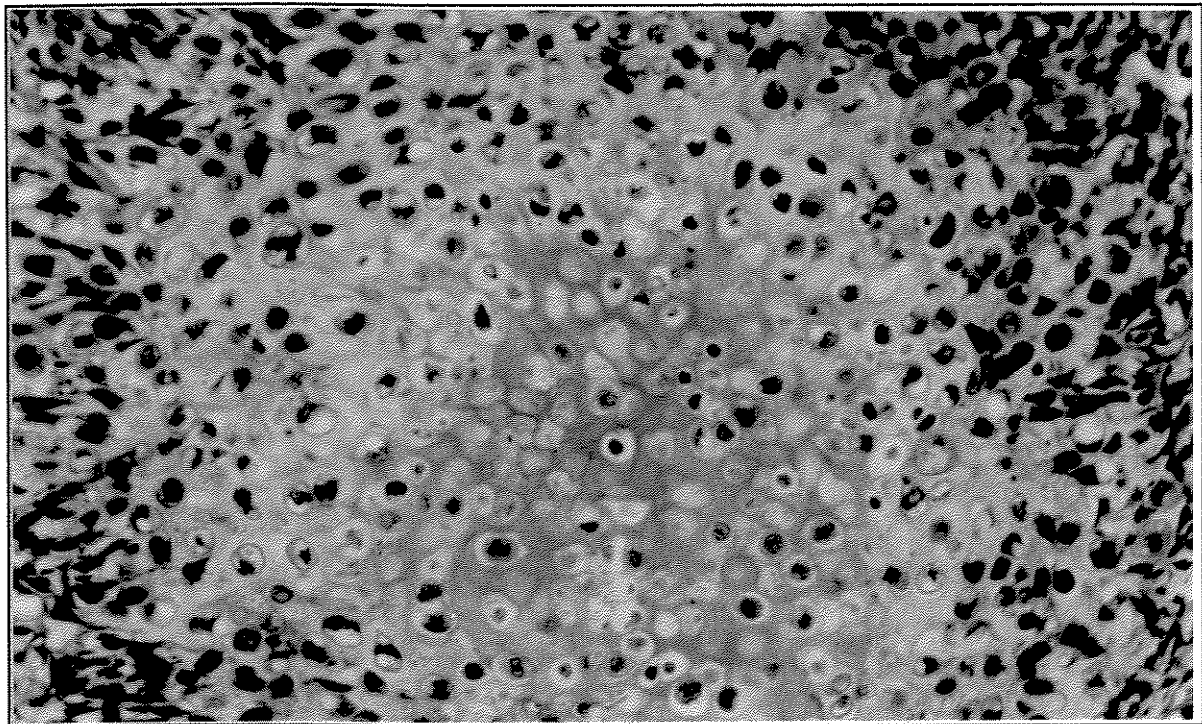


Figura 2. Maior aumento da figura 1, onde observamos células malignas em um estroma condróide. (H&E – 200X)

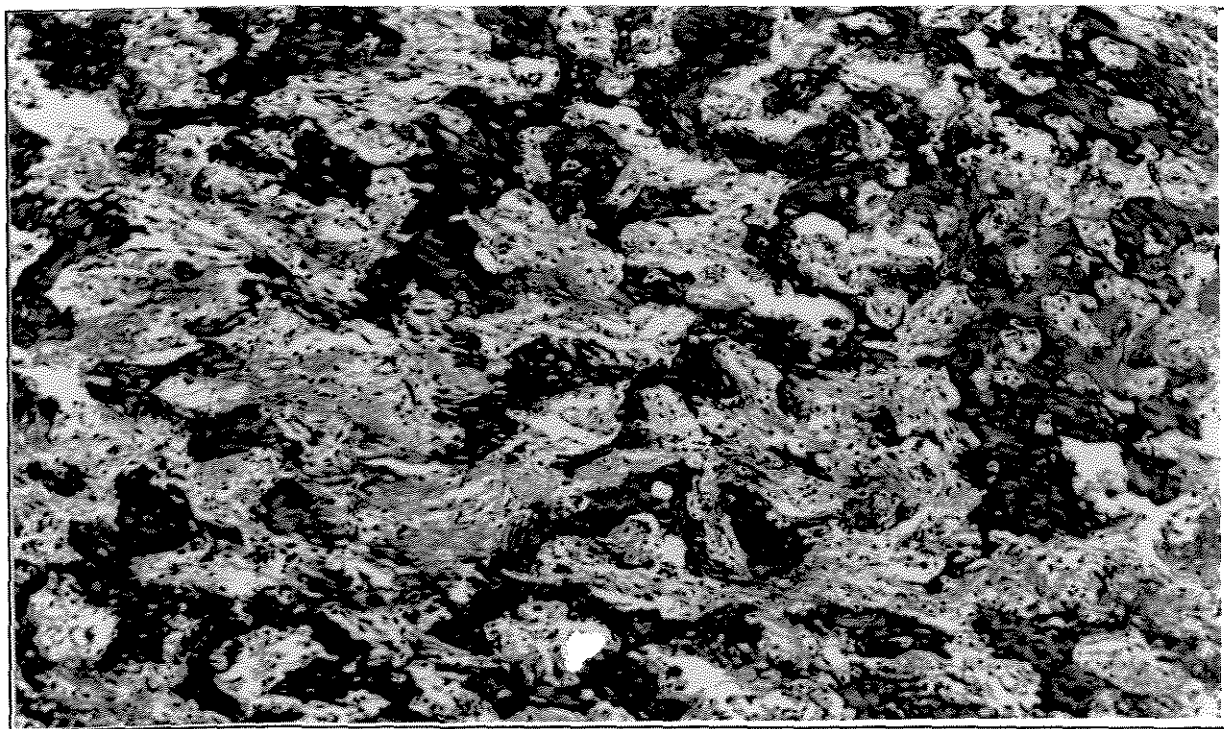


Figura 3. Osteossarcoma do tipo osteoblástico onde observamos a formação de material osteóide irregular. (H&E - 50X)

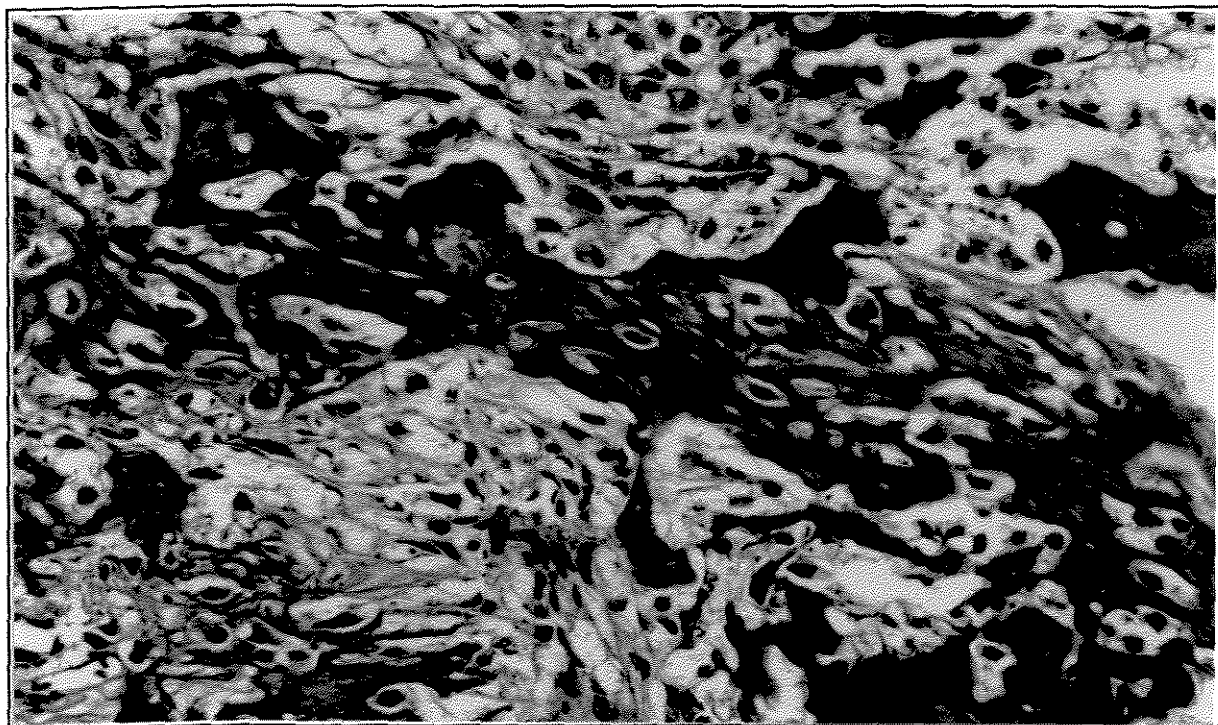


Figura 4. Osteossarcoma osteoblástico mostrando em maior detalhe uma trabécula óssea irregular permeada por células malignas. (H&E - 200X)

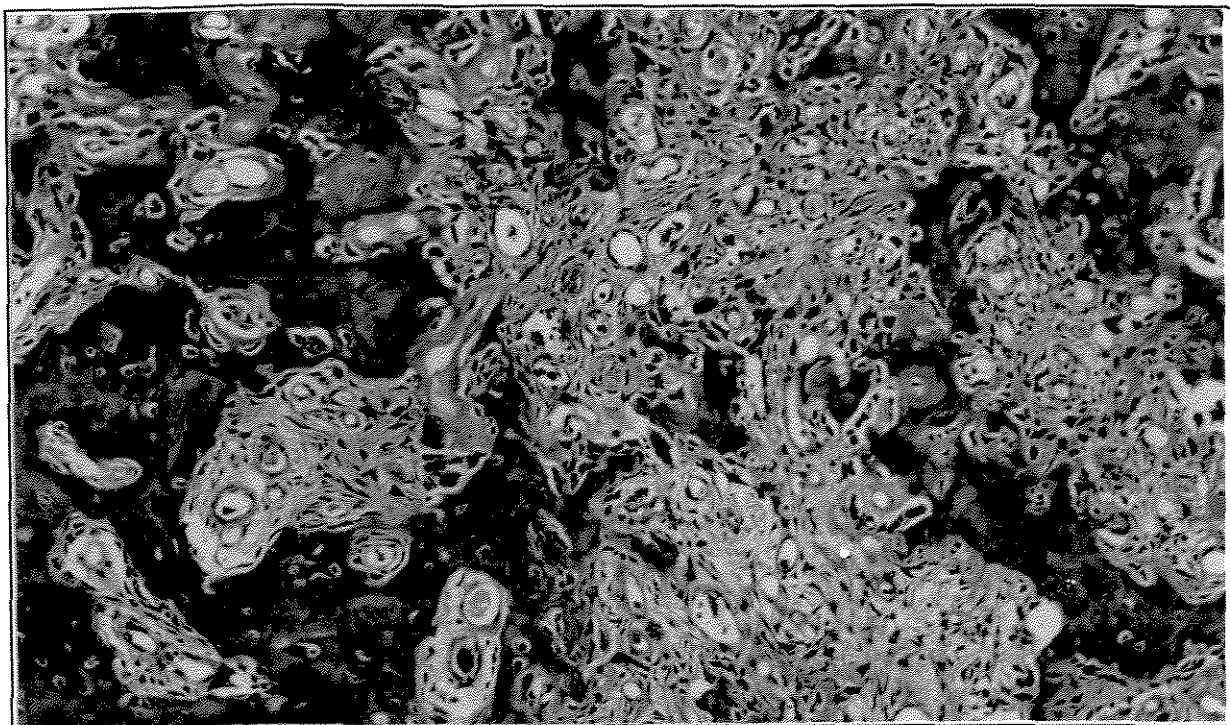


Figura 5. Osteossarcoma de baixo grau com formação de osteóide em estroma fibrovascular celularizado. (H&E – 100X)

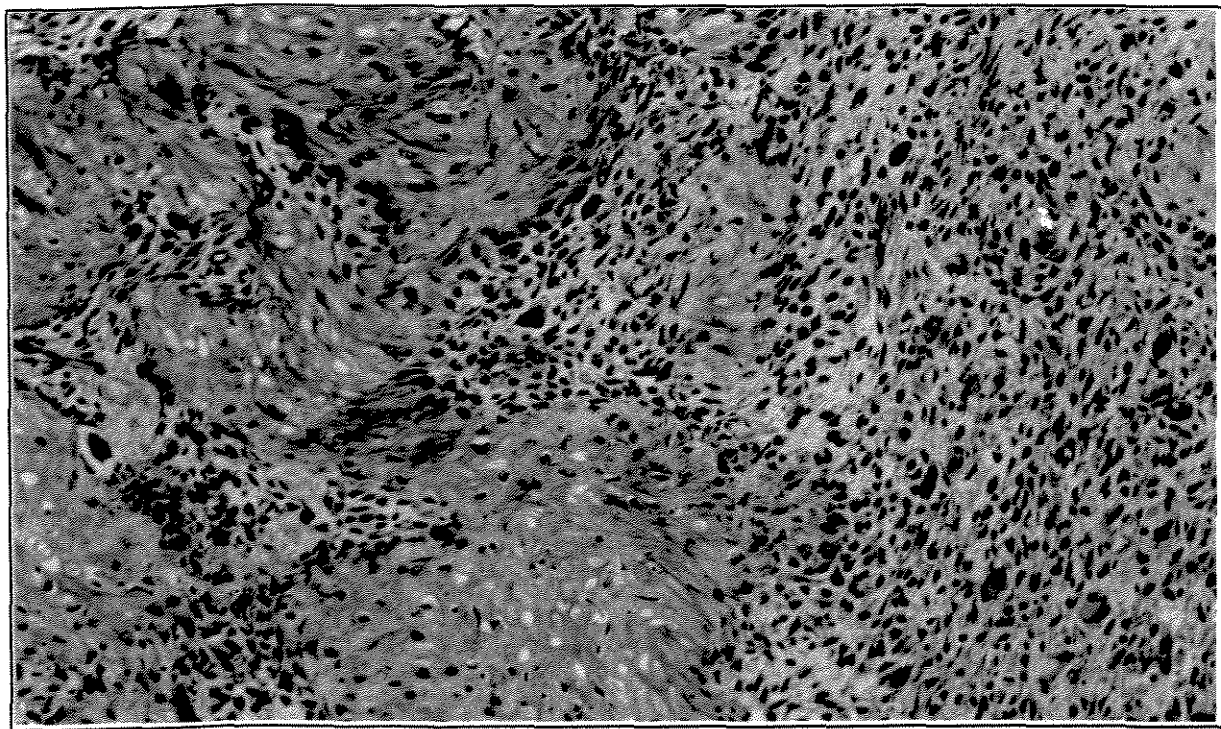


Figura 6. Osteossarcoma de grau intermediário onde observamos um estroma mais celularizado, pleomorfismo celular mais evidente e formação de osteóide. (H&E – 100X)

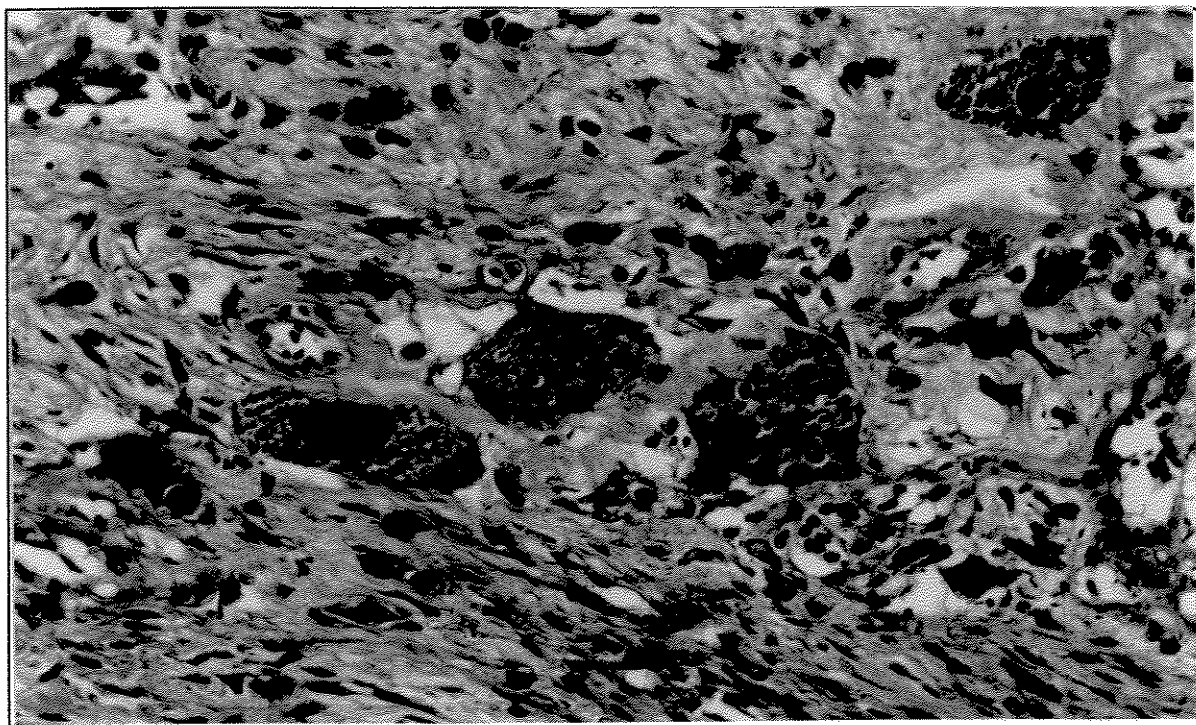


Figura 7. Osteossarcoma de alto grau mostrando acentuado pleomorfismo celular. (H&E – 200X)

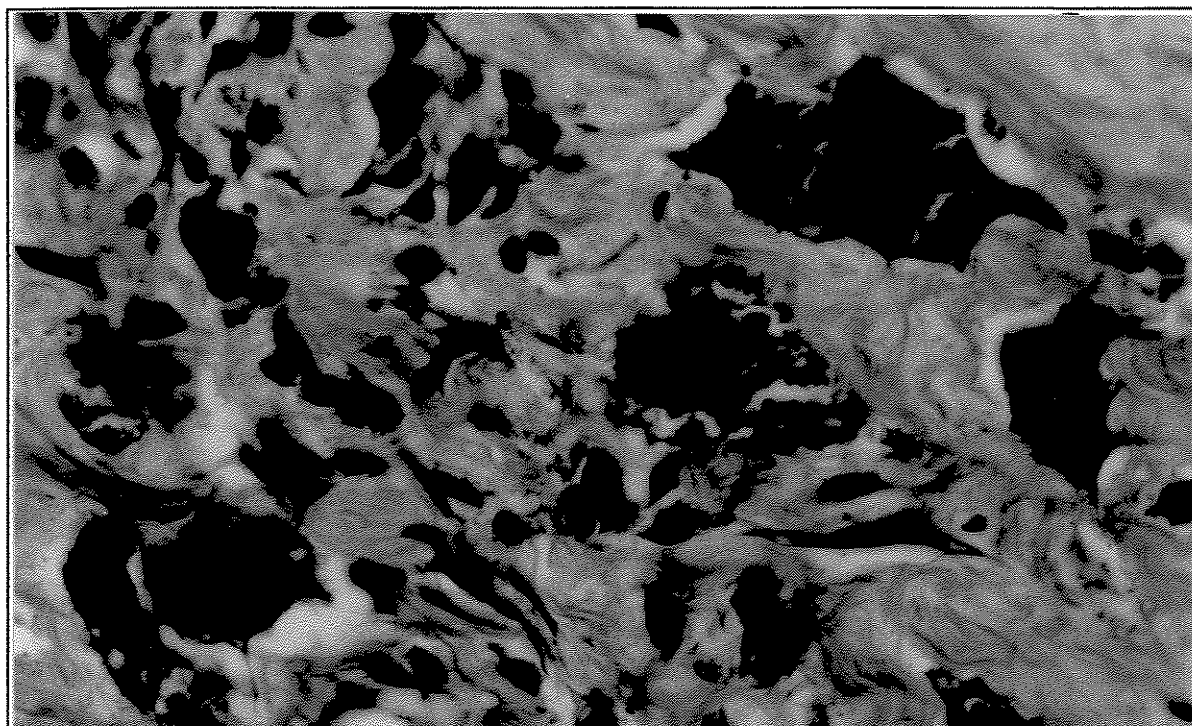


Figura 8. Detalhes de atipias celulares em osteossarcoma de alto grau. (H&E – 400X)

5.3. Características Imunohistoquímicas

5.3.1. p53

A maioria dos casos (52%), foram classificados como positivos, sendo que 3 casos apresentaram positividade fraca, 2 moderada e 8 forte (Figuras 9 e 10). Doze casos (48%) foram negativos para expressão de p53 (Tabela 6 e Gráfico 7).

5.3.2. MDM2

A grande maioria (19 casos – 76%) não apresentou marcação imunohistoquímica para MDM2, sendo classificados como negativos. Apenas 6 casos apresentaram positividade, sendo 4 classificados como fraco e 2 como moderado (Figura 11). Nenhum caso foi classificado como de positividade forte (Tabela 7 e Gráfico 8).

5.3.3. CDK4

Vinte e um casos (84%) foram considerados positivos para CDK4, sendo 10 classificados como marcação forte (Figura 12), 9 como moderado e 2 como fraca. Apenas 4 casos foram classificados como negativos (Tabela 8 e Gráfico 9).

5.3.4. PCNA

Vinte e três casos (92%) foram positivos para PCNA, sendo que 16 foram considerados forte (Figura 13), 4 moderado e 3 fraco. Apenas 2 casos foram considerados negativos (Tabela 9 e Gráfico 10).

5.3.5. Ki-67

A grande maioria dos casos, 22 (88%) foram considerados positivos para o antígeno de proliferação nuclear Ki-67. Sendo que 12 foram considerados positivos forte (Figura 14), 6 moderado e 4 fraco. Apenas 3 casos foram classificados como negativos (Tabela 10 e Gráfico 11).

Tabela 6. Frequência dos casos de acordo com a positividade imunohistoquímica para p53.

p53	Número de casos	Porcentagem (%)
Negativo	12	48
Fracamente positivo	3	12
Moderadamente positivo	2	8
Fortemente positivo	8	32
TOTAL	25	100

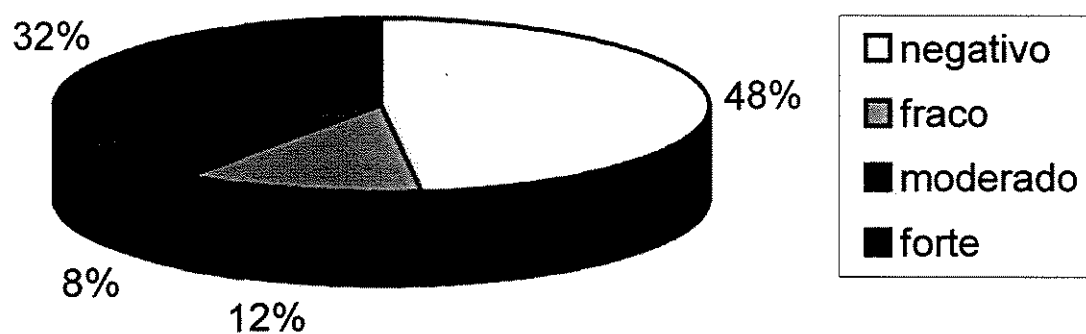


Gráfico 7. Frequência dos casos de acordo com a positividade imunohistoquímica para p53.

Tabela 7. Frequência dos casos de acordo com a positividade imunohistoquímica para MDM2.

MDM2	Número de casos	Porcentagem (%)
Negativo	19	76
Fracamente positivo	4	16
Moderadamente positivo	2	8
Fortemente positivo	0	0
TOTAL	25	100

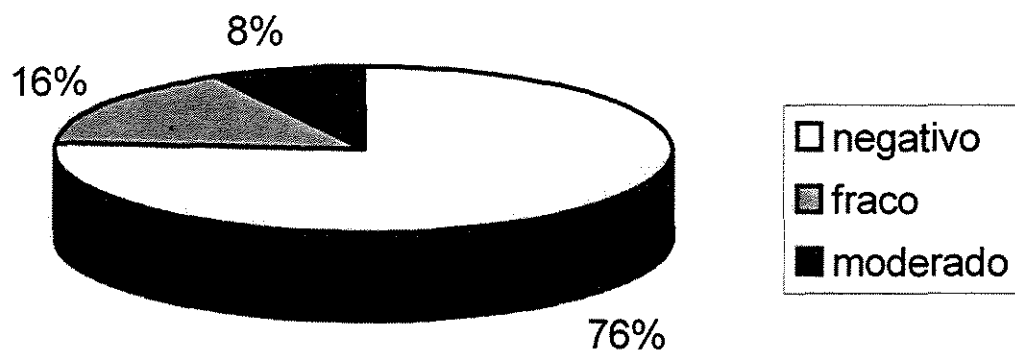


Gráfico 8. Frequência dos casos de acordo com a positividade imunohistoquímica para MDM2.

Tabela 8. Frequência dos casos de acordo com a positividade imunohistoquímica para CDK4.

CDK4	Número de casos	Porcentagem (%)
Negativo	4	16
Fracamente positivo	2	8
Moderadamente positivo	9	36
Fortemente positivo	10	40
TOTAL	25	100

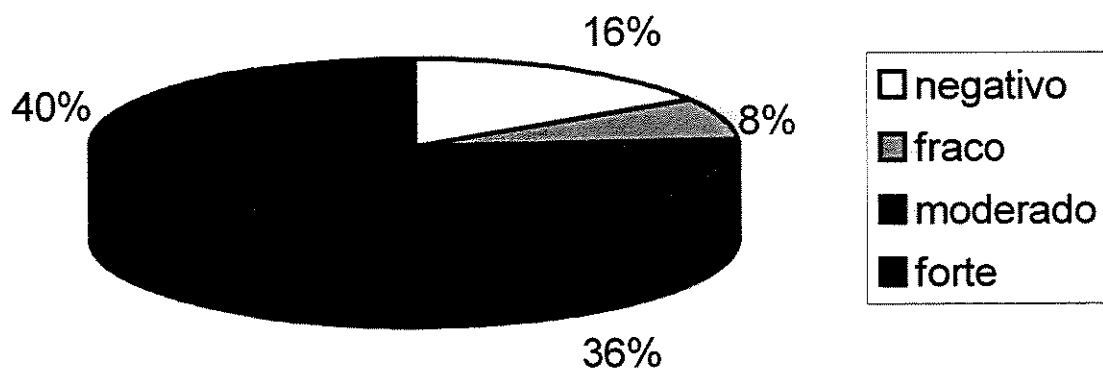


Gráfico 9. Frequência dos casos de acordo com a positividade imunohistoquímica para CDK4.

Tabela 9. Frequência dos casos de acordo com a positividade imunohistoquímica para PCNA.

PCNA	Número de casos	Porcentagem (%)
Negativo	2	8
Fracamente positivo	3	12
Moderadamente positivo	4	16
Fortemente positivo	16	64
TOTAL	25	100

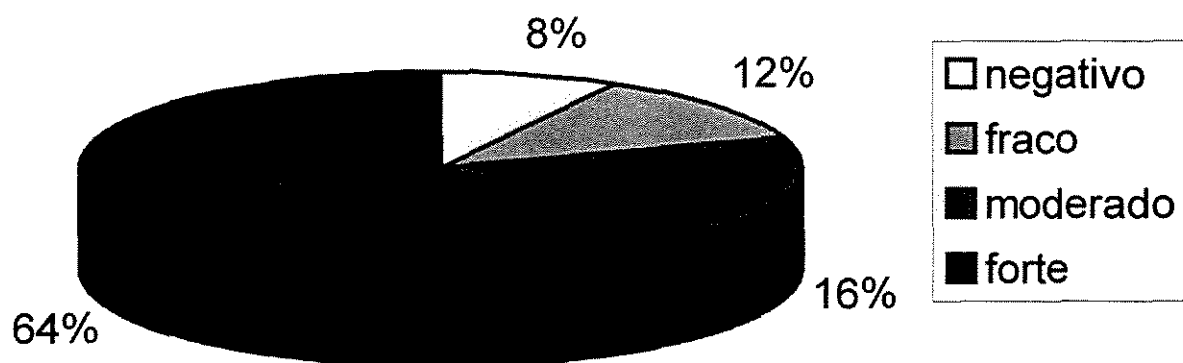


Gráfico 10. Frequência dos casos de acordo com a positividade imunohistoquímica para PCNA.

Tabela 10. Frequência dos casos de acordo com a positividade imunohistoquímica para Ki-67.

Ki-67	Número de casos	Porcentagem (%)
Negativo	3	12
Fracamente positivo	4	16
Moderadamente positivo	6	24
Fortemente positivo	12	48
TOTAL	25	100

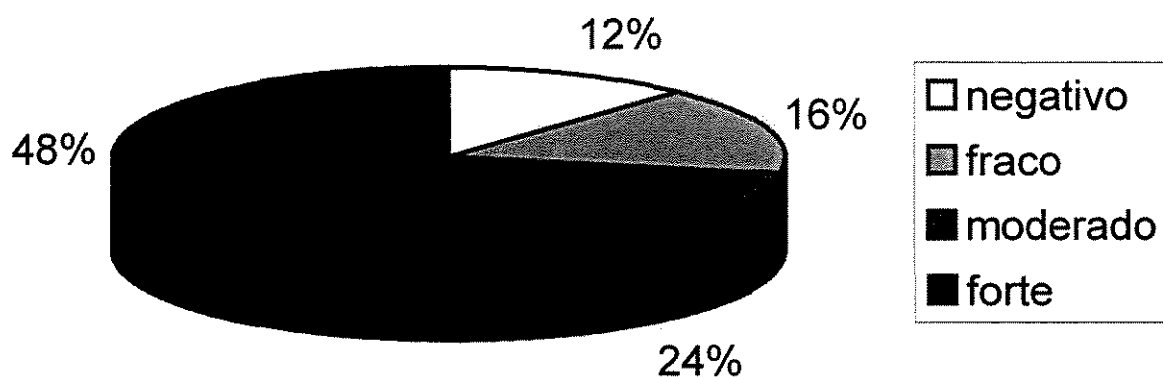


Gráfico 11. Frequência dos casos de acordo com a positividade imunohistoquímica para Ki-67.

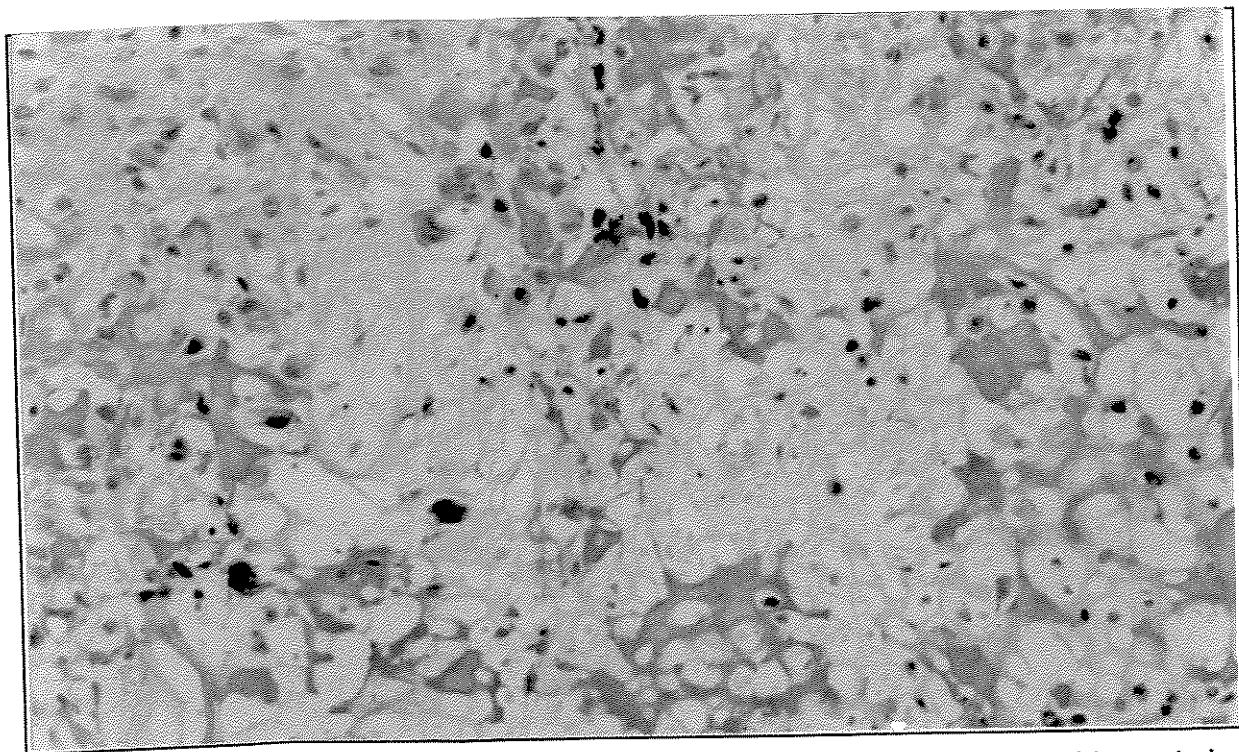


Figura 11. Positividade imunohistoquímica moderada para MDM2. (Imunohistoquímica – 200X)

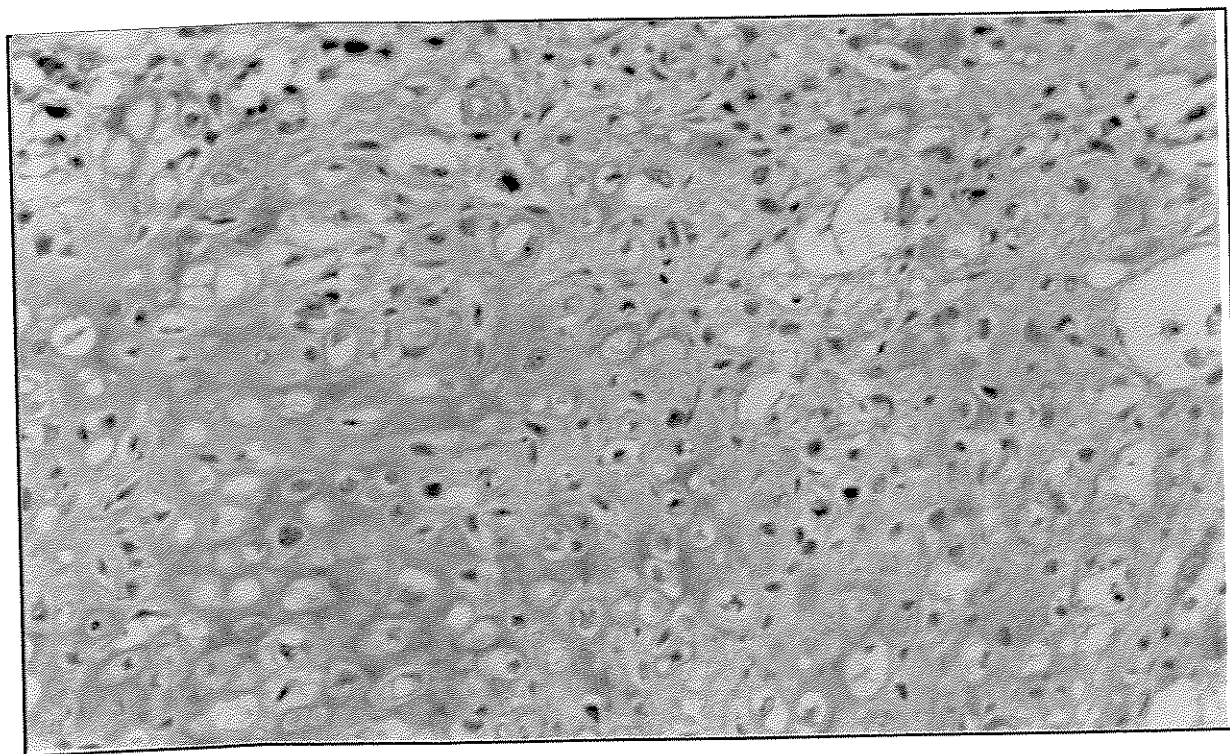


Figura 12. Marcação imunohistoquímica forte para CDK4. (Imunohistoquímica – 200X)

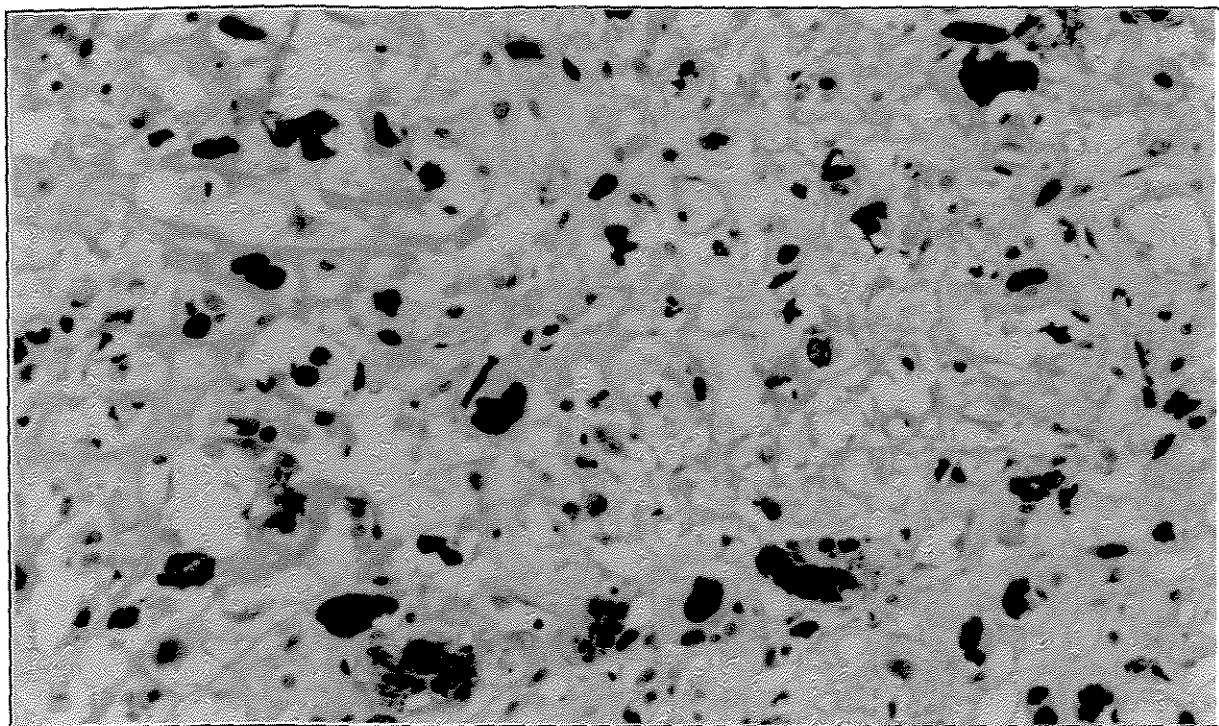


Figura 9. Marcação imunohistoquímica forte para p53, onde observamos a positividade nas células malignas. (Imunohistoquímica – 200X)

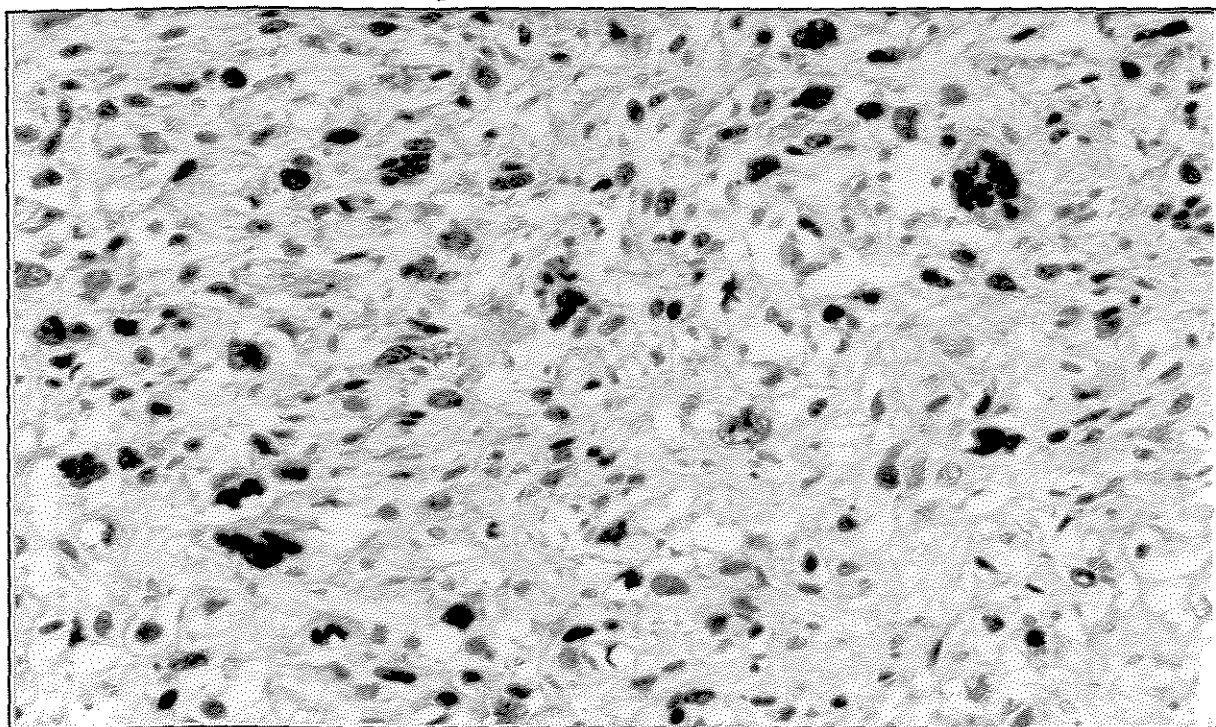


Figura 10. Positividade imunohistoquímica forte para p53 em osteossarcomas. (Imunohistoquímica – 200X)

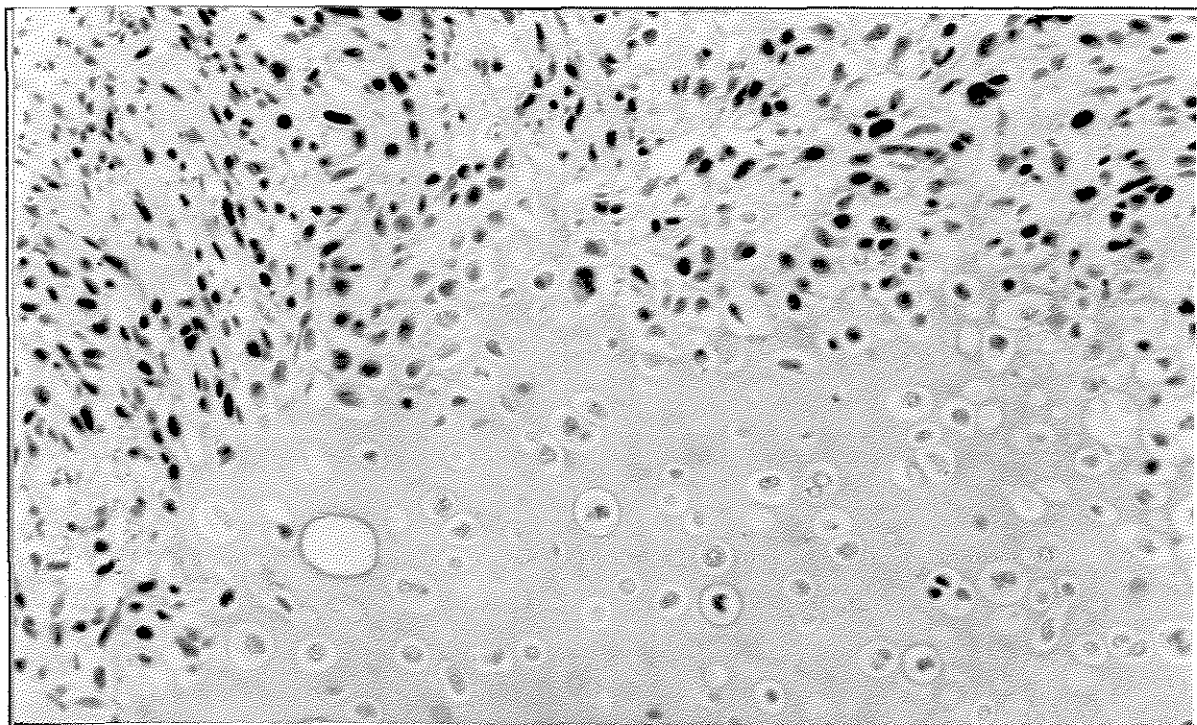


Figura 13. Marcação imunohistoquímica forte para PCNA. (Imunohistoquímica – 200X)

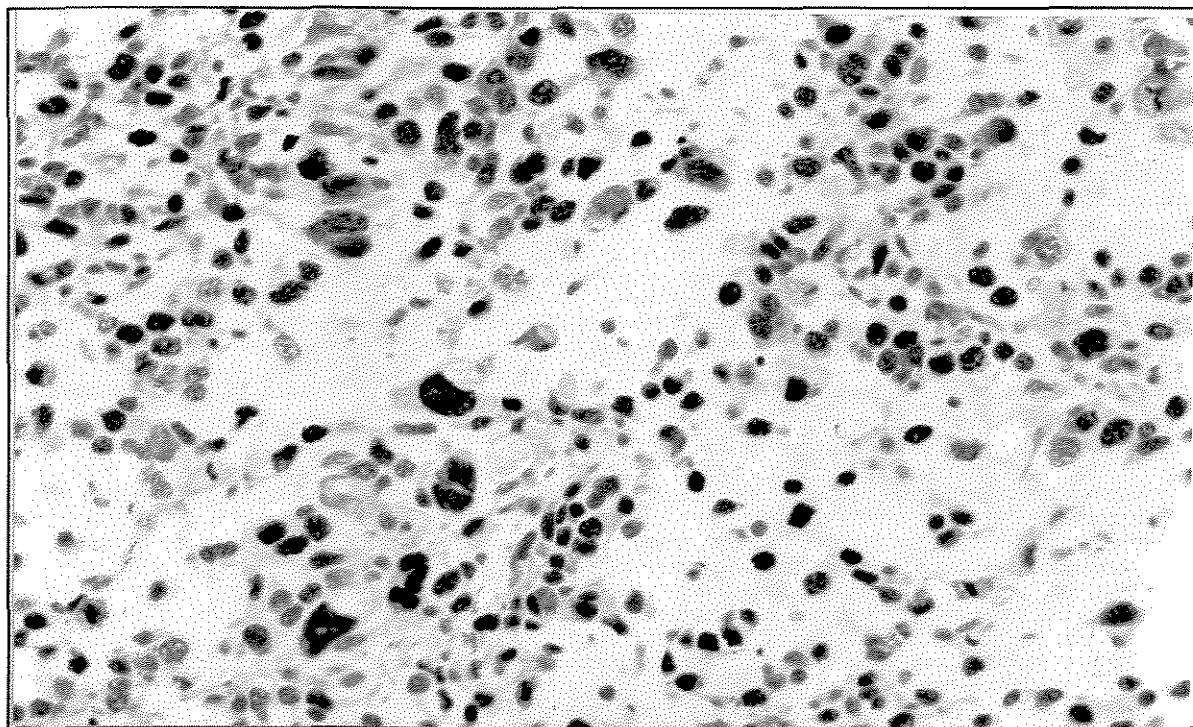


Figura 14. Positividade imunohistoquímica forte para Ki67. (Imunohistoquímica – 200X)

5.4. Tratamento

Vinte e um pacientes, ou seja 84% do total, foram tratados com cirurgia, sendo que 8 deles apenas com cirurgia, em 9 casos associados à quimioterapia, um caso associado à radioterapia e em 3 casos associados tanto à radioterapia quanto à quimioterapia (Tabela 11 e Gráfico 12).

Um paciente foi tratado apenas com radioterapia, outro apenas com quimioterapia e outro caso com a associação da radioterapia com a quimioterapia. No total, a quimioterapia foi utilizada em 14 casos, isolada ou associada com a cirurgia e radioterapia. As drogas utilizadas foram Cisplatina, Doxorrubicina, e Ifosfamida, sendo que a associação mais freqüente foi a de Doxorrubicina com Cisplatina, utilizada em 6 casos. Três pacientes receberam quimioterapia pré-operatória, 1 trans-operatória e os demais pós-operatória.

A radioterapia foi utilizada em 6 casos, com a dose variando de 3000 a 7000 cGy (dose média de 5342,5 cGy).

5.5. Recorrência Local e Metástase

A maioria dos casos (19 – 76%) não apresentou recorrência local do tumor. Cinco casos (20%) apresentaram recorrência local, cerca de 8 meses após o tratamento, sendo que um deles apresentou 2 episódios de recorrência local. Três casos apresentaram tanto a recorrência local quanto metástase após o tratamento (Tabela 12 e Gráfico 13).

Sessenta por cento dos tumores dos pacientes que apresentaram recorrência local estavam localizados na maxila e os outros 40% na mandíbula. Sendo que dois desses pacientes haviam sido tratados apenas por cirurgia, outros dois com a associação da cirurgia com a quimioterapia e outro com a associação da cirurgia com a quimioterapia e a radioterapia.

Informações sobre o tratamento realizado na recorrência local foram obtidas em 4 dos 5 pacientes. O primeiro foi tratado apenas com cirurgia, o segundo com radioterapia, o terceiro com a associação de cirurgia com radioterapia e o quarto com a associação de radioterapia com quimioterapia.

A maioria dos pacientes (20 – 80%) não desenvolveu metástase à distância. No momento do diagnóstico, apenas um paciente apresentava metástase, para os linfonodos regionais. Em 4 casos (16%) foi observada metástase após o tratamento, e em todos os pacientes para os pulmões. Em um caso, além do pulmão, outros locais como a tíbia, a rinofaringe e a pele também estavam comprometidos (Tabela 12 e Gráfico 14).

5.6. Situação Clínica

O tempo de seguimento desses pacientes variou de 1 mês até 40 anos, com uma média de 6 anos. De acordo com a última informação obtida, 13 pacientes evoluíram para óbito, 9 estavam vivos e 3 foram perdidos de vista. Dentre os 13 pacientes que evoluíram para óbito, 11 casos foram devido ao osteossarcoma (recorrência local, metástase ou tumor residual) e dois por outros motivos (1 por cirrose hepática e o outro devido a pneumopatia). Dentre os 9 pacientes que estavam vivos segundo a última informação, 8 estavam sem a doença e 1 com doença em atividade, sendo que este havia desenvolvido recorrência local e metástase para os pulmões, osso rinofaringe e pele. Três pacientes foram perdidos de vista, ou seja, após o tratamento não se conseguiu nenhuma informação (Tabela 13 e Gráfico 15).

Tabela 11. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com o tipo de tratamento

Tipo de tratamento	Número de pacientes	(%)
Cirurgia	8	32
Cirurgia + Quimioterapia	9	36
Cirurgia + Radioterapia	1	4
Cirurgia + Quimioterapia + Radioterapia	3	12
Quimioterapia	1	4
Radioterapia	1	4
Quimioterapia + Radioterapia	1	4
S/ informação	1	4
TOTAL	25	100

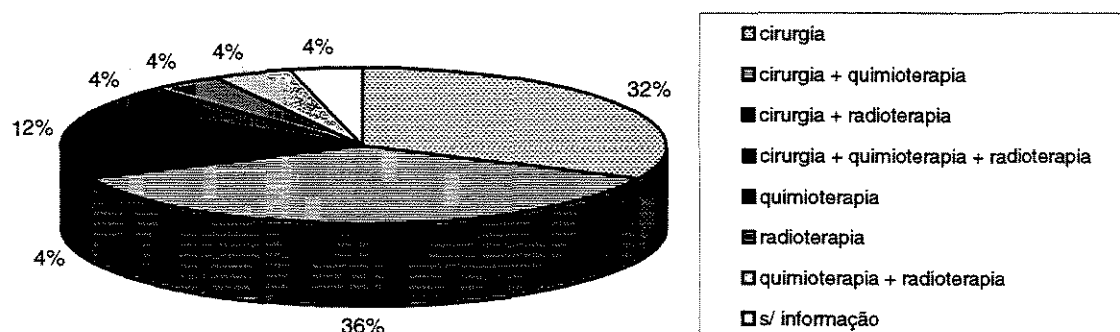


Gráfico 12. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com o tipo de tratamento

Tabela 12. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com a recorrência local e metástase à distância.

Variáveis	Número de pacientes	(%)
Recorrência Local		
Sim	5	20
Não	19	76
s/ informação	1	4
Metástase		
Sim	4	16
Não	20	80
s/ informação	1	4
TOTAL	25	100

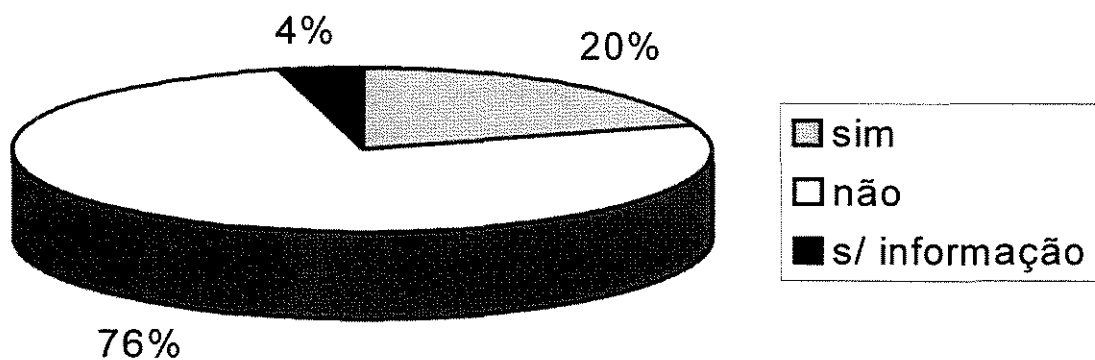


Gráfico 13. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com a recorrência local.

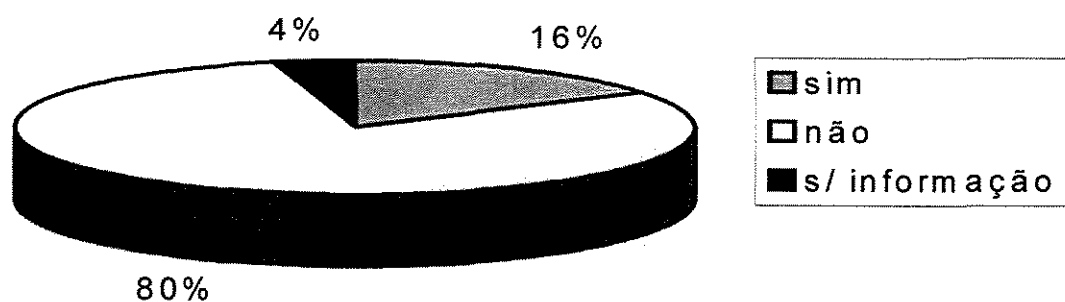


Gráfico 14. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com a metástase à distância.

Tabela 13. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com a situação na última avaliação.

Situação na última avaliação	Número de pacientes	(%)
Vivo sem doença	8	32
Vivo com doença	1	4
Morto pela doença	11	44
Morto por outras causas	2	8
Perdido de vista	3	12
TOTAL	25	100

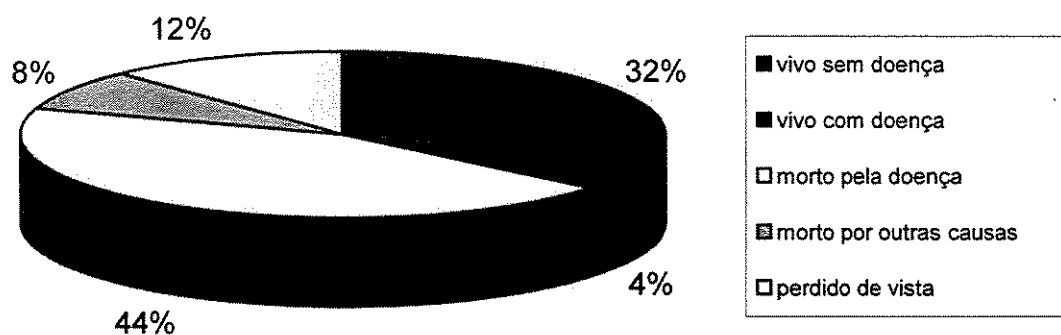


Gráfico 15. Frequência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço de acordo com a situação na última avaliação.

5.7. Correlação de Frequência

A análise de correlação de frequência mostrou relação estatisticamente significativa entre a idade dos pacientes e positividade imunohistoquímica para p53. Todos os 5 pacientes com idade superior a 34 anos foram positivos e 12 dos 20 pacientes (60%) com idade inferior a 20 anos foram negativos ($p=0,05$). A idade também correlacionou com MDM2, sendo que 3 dos 5 pacientes com mais de 34 anos (60%) foram positivos e todos os 9 pacientes com idade inferior a 20 anos foram negativos ($p=0,04$).

Com relação ao gênero, foi observada maior positividade para p53 em mulheres. Nove das 13 pacientes femininas (69%) foram positivas e 8 dos 12 pacientes masculinos (67%) foram negativos ($p=0,07$).

Houve também correlação do local do tumor com a imunopositividade para MDM2. Os tumores em maxila apresentaram maior positividade (4 casos do total de 9, 44%) em relação aos tumores localizados em mandíbula (1 caso do total de 15, 7%) ($p=0,02$).

O tempo de queixa correlacionou com marcação imunohistoquímica para Ki67. Dos 14 pacientes com tempo de queixa menor que 5 meses, 13 (93%) foram positivos, sendo destes 13, 10 com positividade forte ($p=0,03$). Apesar de 78,5% e 70% dos casos terem sido classificados como positivo forte para PCNA e CDK4, respectivamente, em pacientes que tiveram tempo de queixa menor, a correlação não foi estatisticamente significativa.

Os tumores do tipo osteoblástico apresentaram maior imunopositividade para CDK4, PCNA e Ki67 em relação aos tumores classificados como condroblástico. Além disso, todos os casos classificados como de alto grau foram positivos para PCNA, e 91% deles positivos para Ki67. No entanto, essas correlações não foram estatisticamente significantes. O grau de malignidade mostrou correlação estatisticamente significativa

somente com a expressão para p53, onde dos 11 tumores classificados como de alto grau, 8 foram positivos (73%) e dos 14 de baixo grau ou grau intermediário, 9 foram negativos (64%) ($p=0,06$).

Várias correlações foram observadas entre os marcadores imunohistoquímicos. Os tumores positivos para Ki67 geralmente foram também positivos para CDK4 ($p=0,0005$), assim como entre os tumores positivos para Ki67 e PCNA ($p=0,0002$) e entre PCNA e CDK4 ($p=0,004$).

Apesar da correlação entre modalidade de tratamento e local do tumor não ter sido estatisticamente significativa, dentre os 7 pacientes tratados somente com cirurgia, 6 (86%) tinham tumores localizados na mandíbula.

Recorrência local foi maior em pacientes do gênero masculino (4 de 5 casos), com tempo de queixa menor (4 de 5 casos), com tumores do tipo condroblástico (4 de 5 casos) e positivos para CDK4 (4 de 5 casos). No entanto, recorrência estava correlacionada estatisticamente significativa somente com metástase à distância. Dos 4 pacientes que desenvolveram metástase à distância, 3 tiveram recorrência local ($p=0,008$).

Com relação a situação clínica do paciente, foi observado que recorrência local e desenvolvimento de metástase à distância foram as variáveis mais importantes. Todos os 5 pacientes que apresentaram recorrência local morreram da doença ($p=0,04$), assim como 75% dos pacientes que desenvolveram metástase também evoluíram para óbito ($p=0,41$) (Tabelas 14, 15 e 16).

Tabela 14. Correlação de frequência entre o tipo histológico e as demais variáveis.

Tipo Histológico							
	Osteoblástico			Condroblástico			
Idade	09-20 (29%)	21-34 (42%)	>34 (29%)	09-20 (39%)	21-34 (45%)	>34 (13%)	p = 0,77
Gênero	M (57%) F (43%)			M (45%) F (55%)			p = 0,56
Localização	Mandíbula (50%) Maxila (50%)			Mandíbula (67%) Maxila (33%)			p = 0,46
Tempo de queixa	1 a 5 meses (57%) >5 meses (43%)			1 a 5 meses (55%) >5 meses (45%)			p = 0,94
Tamanho	1 a 5 cm (57%) >5 cm (43%)			1 a 5 cm (45%) >5 cm (55%)			p = 0,56
Grau de malignidade	G1+G2 (71%) G3 (29%)			G1+G2 (50%) G3 (50%)			p = 0,33
P53	Negativo (43%) Positivo (57%)			Negativo (50%) Positivo (50%)			p = 0,74
MDM2	Negativo (71%) Positivo (29%)			Negativo (78%) Positivo (22%)			p = 0,73
CDK4	Negativo (14%) Positivo (86%)			Negativo (18%) Positivo (82%)			p = 0,69
PCNA	Negativo (0%) Positivo (100%)			Negativo (11%) Positivo (89%)			p = 0,44
Ki67	Negativo (0%) Positivo (100%)			Negativo (17%) Positivo (83%)			p = 0,50
Tratamento	Cir (28%)			Cir (33%)			p = 0,42
	Cir + Qt (57%)			Cir + Qt (27%)			
	Cir + Qt + Rxt ou Cir + Rxt (0%)			Cir + Qt + Rxt ou Cir + Rxt (22%)			
	Outros (15%)			Outros (18%)			
Recorrência	Não (85%) Sim (15%)			Não (77%) Sim (23%)			p = 0,65
Metástase	Não (85%) Sim (15%)			Não (83%) Sim (17%)			p = 0,80
Situação clínica	Vivo sem doença (14%)			Vivo sem doença (44%)			p = 0,28
	Morto pela doença (71%)			Morto pela doença (33%)			
	Morto por outras causas (0%)			Morto por outras causas (11%)			
	Perdido de vista (15%)			Perdido de vista (11%)			

G1=baixo grau, G2=grau intermediário, G3=alto grau, Cir=cirurgia, Qt=quimioterapia, Rxt=radioterapia.

Tabela 15. Correlação de frequência entre o grau de malignidade e as demais variáveis.

Grau de malignidade							
	G1 + G2			G3			
Idade	09-20 (43%)	21-34 (36%)	>34 (21%)	09-20 (27%)	21-34 (54%)	>34 (19%)	p = 0,62
Gênero	M (43%) F (57%)			M (54%) F (46%)			p = 0,56
Localização	Mandíbula (54%) Maxila (46%)			Mandíbula (73%) Maxila (27%)			p = 0,34
Tempo de queixa	1 a 5 meses (43%) >5 meses (57%)			1 a 5 meses (73%) >5 meses (27%)			p = 0,13
Tamanho	1 a 5 cm (36%) >5 cm (64%)			1 a 5 cm (63%) >5 cm (37%)			p = 0,16
Tipo histológico	Condro (64%) Osteo (36%)			Condro (81%) Osteo (19%)			p = 0,33
P53	Negativo (64%) Positivo (35%)			Negativo (27%) Positivo (72%)			p = 0,06
MDM2	Negativo (71%) Positivo (29%)			Negativo (81%) Positivo (19%)			p = 0,54
CDK4	Negativo (14%) Positivo (86%)			Negativo (18%) Positivo (82%)			p = 0,93
PCNA	Negativo (14%) Positivo (86%)			Negativo (0%) Positivo (100%)			p = 0,40
Ki67	Negativo (14%) Positivo (86%)			Negativo (9%) Positivo (91%)			p = 0,38
Tratamento	Cir (28%) Cir + Qt (43%) Cir + Qt + Rxt ou Cir + Rxt (7%) Outros (22%)			Cir (36%) Cir + Qt (27%) Cir + Qt + Rxt ou Cir + Rxt (27%) Outros (10%)			p = 0,44
Recorrência	Não (85%) Sim (15%)			Não (73%) Sim (27%)			p = 0,42
Metástase	Não (85%) Sim (15%)			Não (82%) Sim (18%)			p = 0,49
Situação clínica	Vivo sem doença (21%) Morto pela doença (50%) Morto por outras causas (14%) Perdido de vista (15%)			Vivo sem doença (54%) Morto pela doença (36%) Morto por outras causas (0%) Perdido de vista (10%)			p = 0,28

G1=baixo grau, G2=grau intermediário, G3=alto grau, **condro**=condroblástico, **osteo**=osteoblástico, **Cir**=cirurgia, **Qt**=quimioterapia, **Rxt**=radioterapia.

Tabela 16. Correlação de frequência entre as variáveis

Correlação	Nível de significância
Idade X p53	p = 0,05
Idade X MDM2	p = 0,04
Local do tumor X MDM2	p = 0,02
Tempo de queixa X Ki67	p = 0,03
CDK4 X PCNA	p = 0,004
CDK4 X Ki67	p = 0,0005
PCNA X Ki67	p = 0,0002
Recorrência local X Metástase	p = 0,008
Recorrência local X Situação clínica	p = 0,04

5.8. Sobrevida Global

De acordo com a análise da sobrevida global, observamos que a maioria dos pacientes que evoluíram para óbito morreram em menos de 5 anos após o início do tratamento. A sobrevida global em 5 e 10 anos foi 59% e 49%, respectivamente. A taxa de sobrevida volta a cair novamente apenas depois de 35 anos de seguimento, correspondendo aos pacientes que haviam sido curados do tumor e morreram por outros motivos, um por pneumopatia e o outro por cirrose hepática. Desta forma, observamos que de acordo com a última informação obtida, 35% dos pacientes se encontravam vivos e 65% mortos (Tabela 17 e Gráfico 16).

Comparando as curvas de sobrevida de acordo com os dados clínicos, histológicos e imunohistoquímicos encontramos algumas informações importantes. De acordo com a idade, verificamos que houve um maior índice de sobrevida nos pacientes com mais de 24 anos. Após 5 anos, 61% deles se encontravam vivos, mesma porcentagem encontrada após 10 anos. Por outro lado, os pacientes com menos de 24 anos apresentaram taxa de sobrevida de 42% após 10 anos (Tabela 18 e Gráfico 17).

De acordo com o gênero, observamos que as mulheres apresentaram uma maior sobrevida após 5 e 10 anos se comparadas aos homens, onde 64% estavam vivas após 10 anos contra apenas 35% dos homens (Tabela 19 e Gráfico 18).

Correlacionando a sobrevida global com o tempo de queixa dos pacientes, verificamos que após 5 anos, os pacientes com maior tempo de queixa tinham uma porcentagem de sobrevida maior, 68%, se comparados aos pacientes com menor tempo de queixa com uma porcentagem de 51% (Tabela 20 e Gráfico 19).

Analisando os paciente que tinham história de radioterapia prévia para o tratamento de outro tumor, observamos que a maioria deles evoluíram para óbito até 5 anos após o

início do tratamento, enquanto que a taxa de sobrevida para os demais pacientes foi de 65% e 53% em 5 e 10 anos, respectivamente. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,004$) (Tabela 21 e Gráfico 20).

De acordo com o tamanho clínico do tumor, observamos que após 5 anos de seguimento a sobrevida foi melhor para os pacientes com tumores menores que 5 cm (63%). No entanto, após 10 anos a taxa de sobrevida foi inferior em pacientes com tumores menores que 5 cm (43%), comparados aos 58% dos pacientes que apresentavam tumores maiores que 5 cm (Tabela 22 e Gráfico 21).

Analizando a sobrevida de acordo com a localização do tumor, observamos uma porcentagem maior de pacientes vivos em 5 e 10 anos naqueles que apresentavam o tumor localizado na mandíbula (Tabela 23 e Gráfico 22).

Conforme o tipo histológico do tumor, observamos uma maior taxa de sobrevida entre os pacientes que apresentaram tumor do tipo condroblástico, correspondendo a 68% e 61% em 5 e 10 anos de seguimento, respectivamente. Por outro lado, pacientes com tumores do tipo osteoblástico apresentaram sobrevida de 35% e 17% nos mesmos períodos. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,02$) (Tabela 24 e Gráfico 23). No entanto, não houve correlação estatisticamente significativa entre a sobrevida global e o grau de malignidade do tumor, onde após 10 anos, 61% dos pacientes com tumores de alto grau e 44% dos pacientes com tumores de grau intermediário estavam vivos. O único paciente que apresentava um tumor de baixo grau de malignidade morreu após 6 anos de seguimento. (Tabela 25 e Gráfico 24).

De acordo com a marcação imunohistoquímica, os casos positivos para p53 tiveram uma taxa de sobrevida menor após 5 e 10 anos (52% e 39%, respectivamente), se comparados aos casos negativos (70% e 60%) (Tabela 26 e Gráfico 25). O mesmo pode ser

observado para a marcação de CDK4, PCNA e Ki67, sendo que para esses três marcadores, em todos os casos negativos, os pacientes estavam vivos após 10 anos de seguimento. Nos casos positivos a porcentagem de pacientes vivos após 10 anos foi de 36% para CDK4, 43% para PCNA e 40% para Ki67 (Tabelas 27, 28 e 29 e Gráficos 26, 27 e 28). Por outro lado, para o marcador MDM2 ocorreu o inverso, onde após 10 anos de seguimento, os casos positivos apresentaram porcentagem de sobrevida de 63%, sendo maior que os casos negativos (45%) (Tabela 30 e Gráfico 29). No entanto, apesar das diferenças nas taxas de sobrevida de acordo com as marcações imunohistoquímicas, não foram estatisticamente significantes.

Segundo análise do tipo de tratamento realizado, observamos que após 5 anos de seguimento, 86% dos pacientes tratados apenas por cirurgia estavam vivos, sendo que após 10 anos essa porcentagem caiu para 72%. Por outro lado, após 5 anos, 38% dos pacientes tratados pela associação da cirurgia com a quimioterapia estavam vivos, e após 10 anos este número caiu para 25%. Já os pacientes tratados pela associação da cirurgia, quimioterapia e radioterapia, apresentaram uma taxa de sobrevida de 75% após 10 anos de seguimento. Os demais pacientes, tratados apenas por quimioterapia e ou radioterapia morreram antes de 5 anos após o início do tratamento (Tabela 31 e Gráfico 30).

Outro dado importante observado foi que todos os pacientes que apresentaram recorrência local evoluíram para óbito. Os pacientes que não apresentaram recorrência local tiveram sobrevida de 71% e 57% em 5 e 10 anos, respectivamente. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,01$) (Tabela 32 e Gráfico 31). Já nos casos que apresentaram metástase, todos os pacientes também se encontravam mortos, no entanto após 15 anos de seguimento (Tabela 33 e Gráfico 32).

Tabela 17. Análise da sobrevida global de acordo com o tempo de seguimento (anos).

Sobrevida Global	
Anos	Pacientes vivos (%)
0	100
5	59
10	49
15	41
20	41
25	41
30	41
35	41
40	20

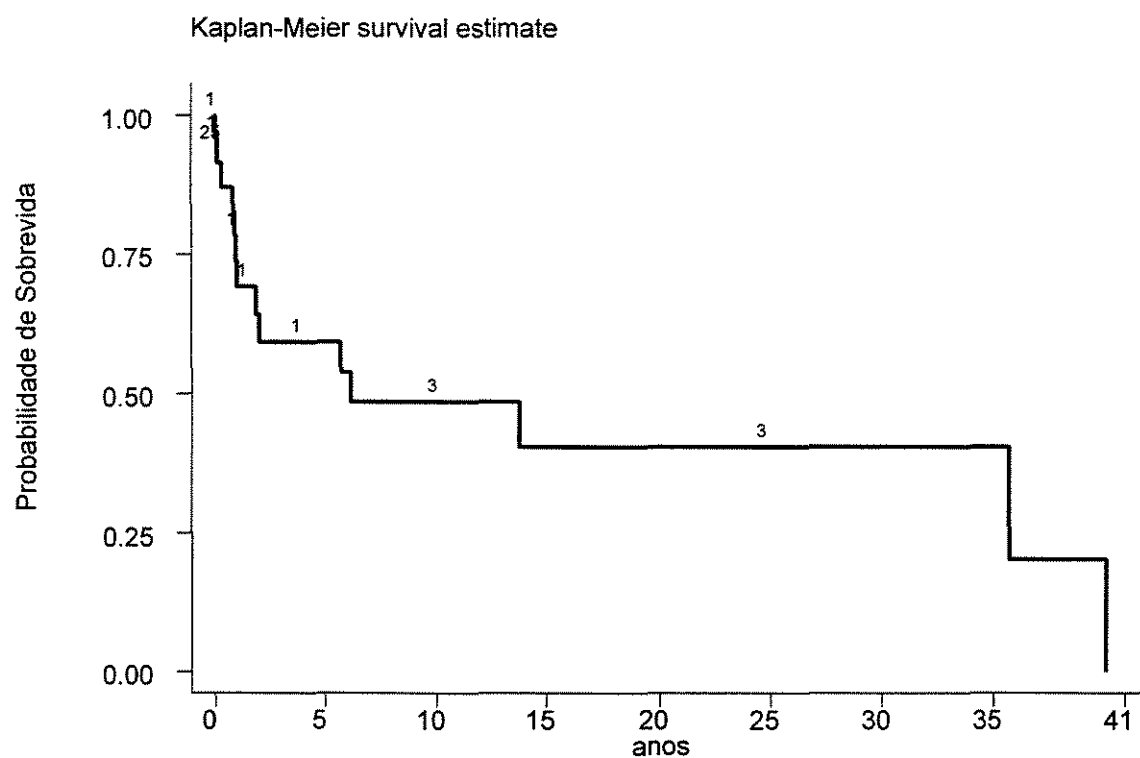


Gráfico 16. Análise da sobrevida global de acordo com o tempo de seguimento (anos).

Tabela 18. Análise da sobrevida global de acordo com a idade dos pacientes.

Sobrevida		
Idade	5 anos	10 anos
≤ 24 anos	59%	42%
> 24 anos	61%	61%

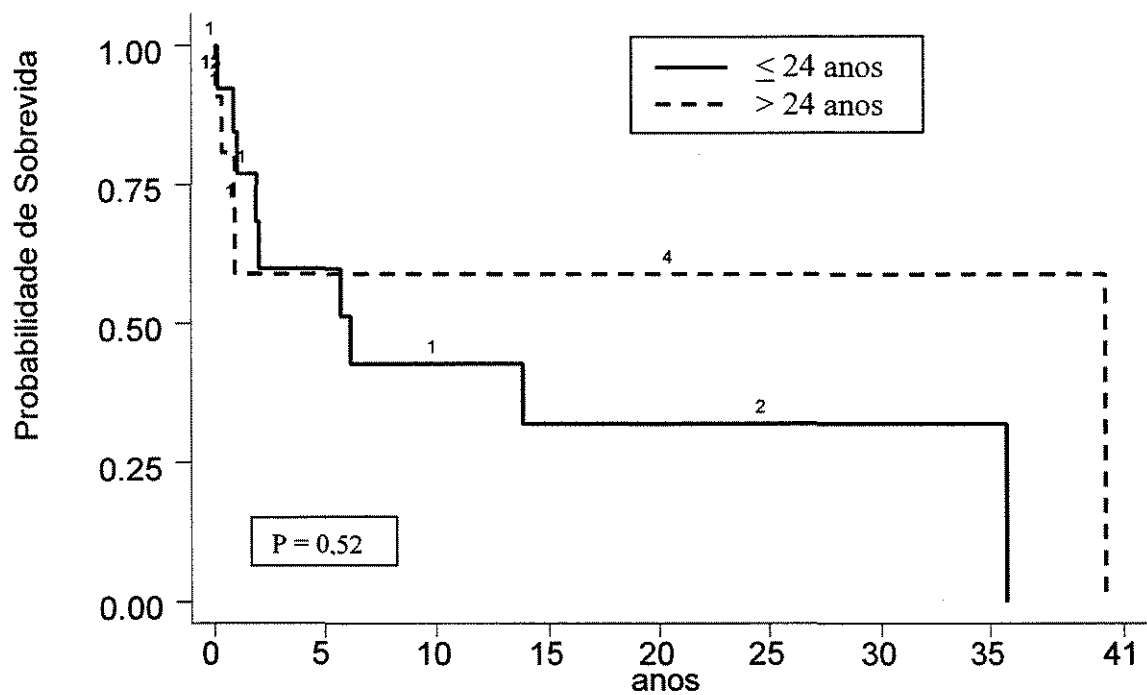


Gráfico 17. Análise da sobrevida global de acordo com a idade dos pacientes.

Tabela 19. Análise da sobrevida global de acordo com o gênero.

Sobrevida		
Gênero	5 anos	10 anos
Masculino	46%	35%
Feminino	75%	64%

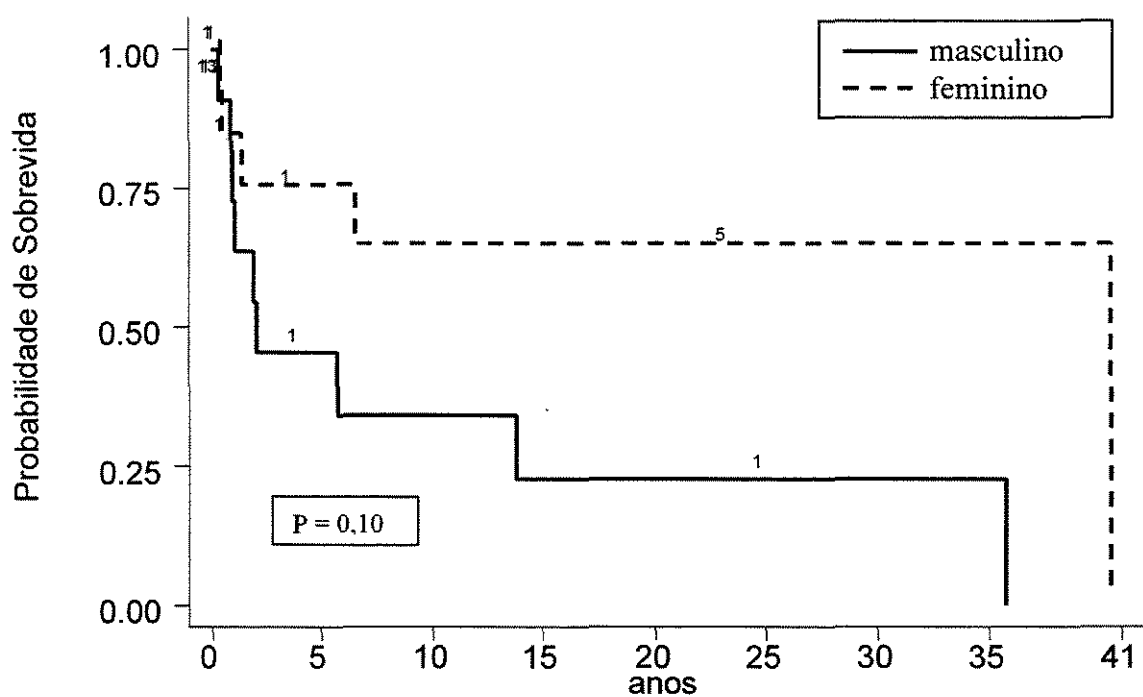


Gráfico 18. Análise da sobrevida global de acordo com o gênero.

Tabela 20. Análise da sobrevida global de acordo com o tempo de queixa.

Sobrevida		
Tempo de queixa	5 anos	10 anos
≤ 5 meses	51%	51%
> 5 meses	68%	45%

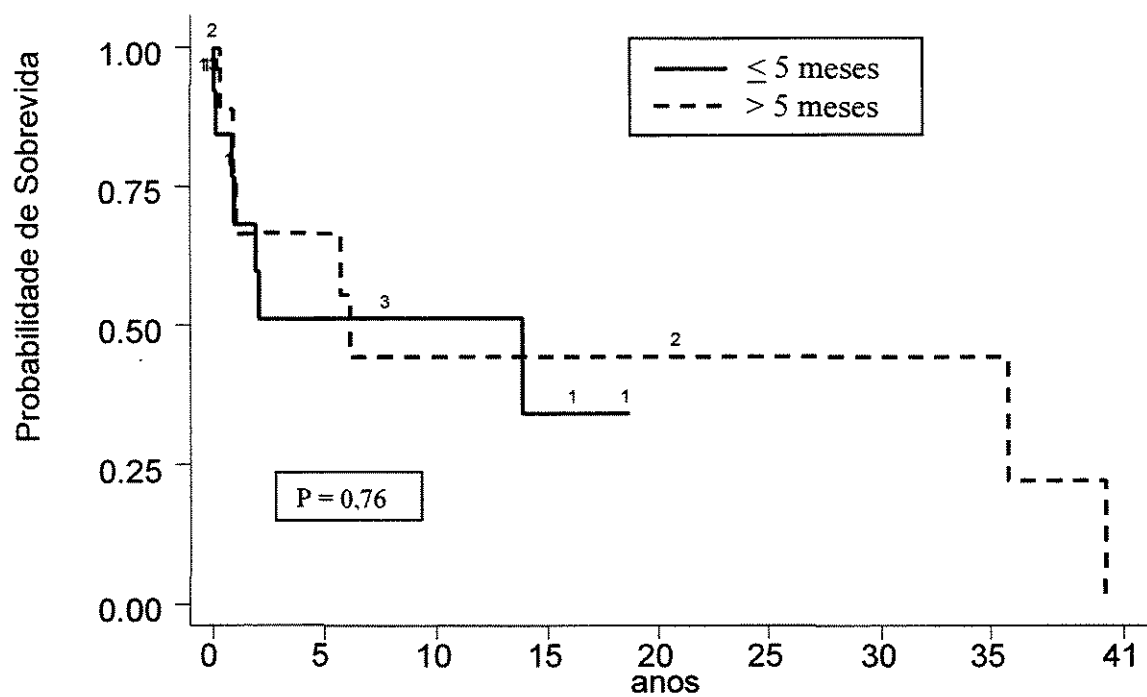


Gráfico 19. Análise da sobrevida global de acordo com o tempo de queixa.

Tabela 21. Análise da sobrevida global de acordo com a história de radioterapia prévia.

Radioterapia prévia	Sobrevida	
	5 anos	10 anos
Sim	0%	0%
Não	65%	53%

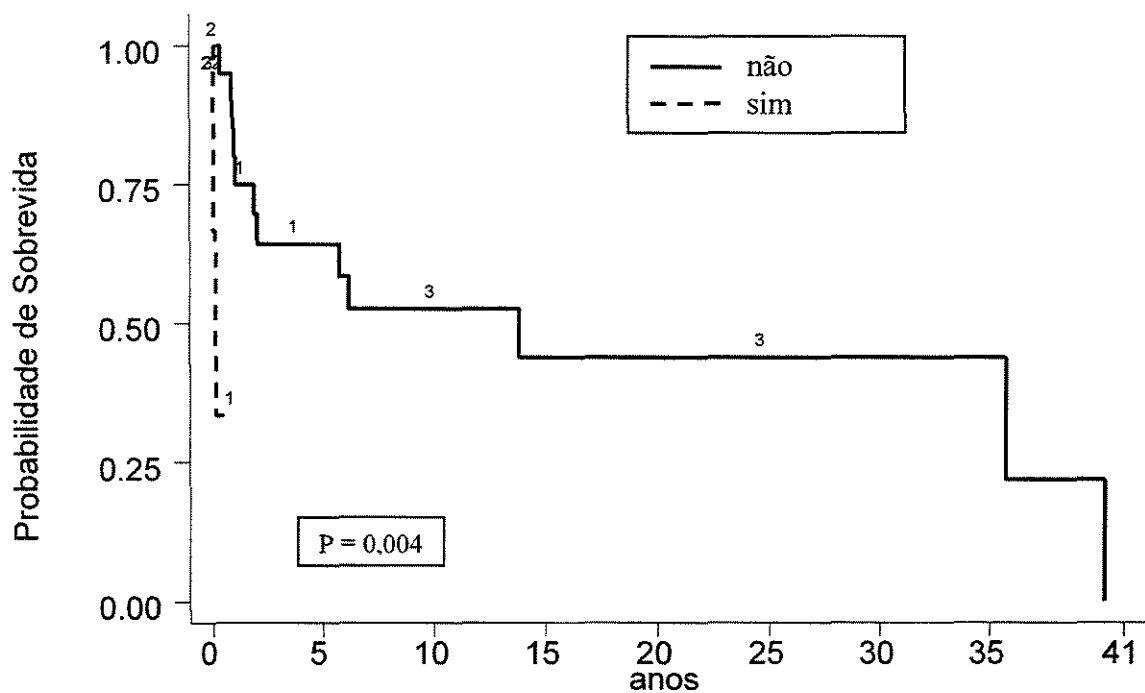


Gráfico 20. Análise da sobrevida global em de acordo com a história de radioterapia prévia.

Tabela 22. Análise da sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com o tamanho clínico do tumor.

Sobrevida		
Tamanho do tumor	5 anos	10 anos
≤ 5 cm	63%	43%
> 5 cm	58%	58%

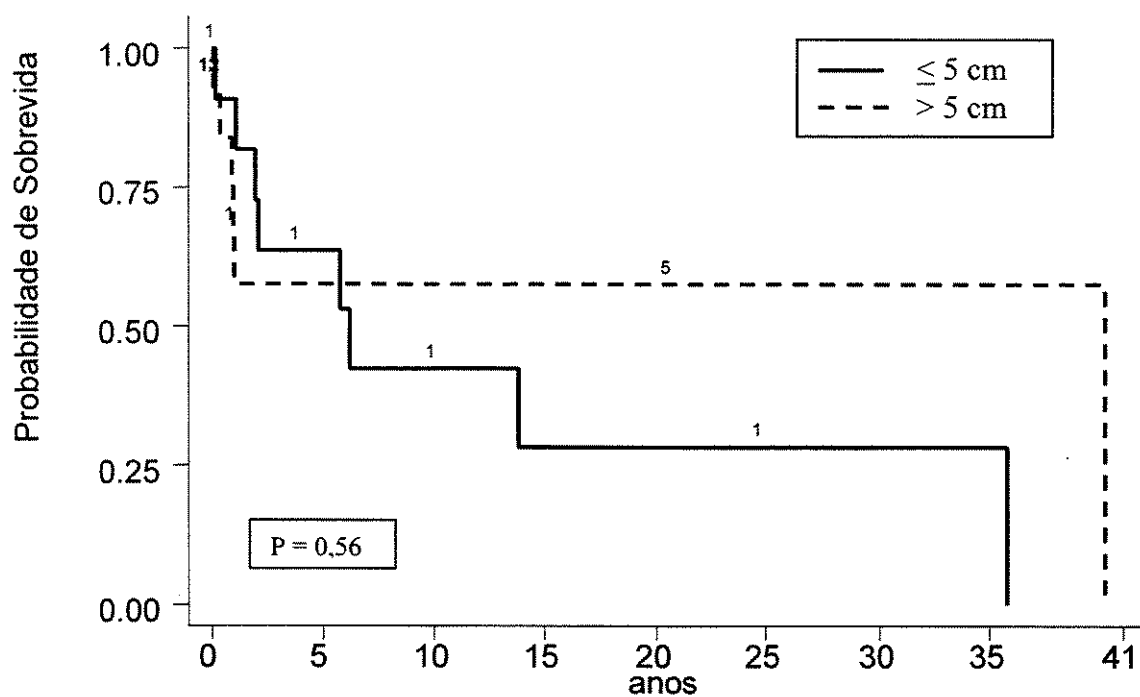


Gráfico 21. Análise da sobrevida global de acordo com o tamanho clínico do tumor.

Tabela 23. Análise da sobrevida global de acordo com a localização do tumor.

Sobrevida		
Localização	5 anos	10 anos
Mandíbula	77%	60%
Maxila	33%	33%

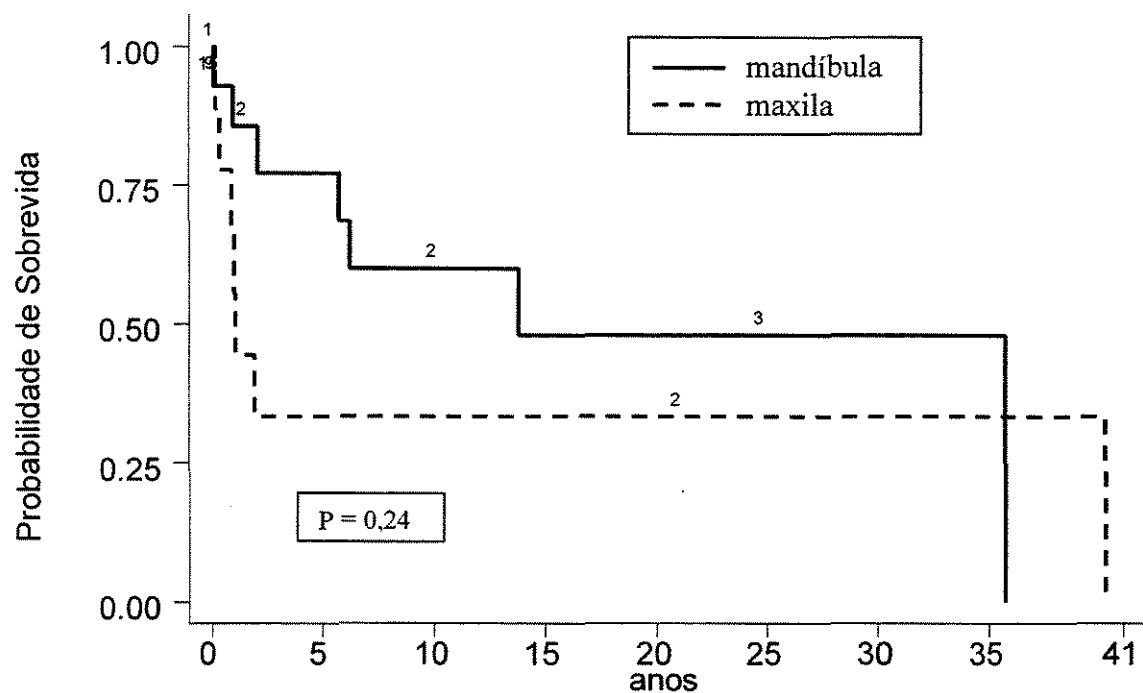


Gráfico 22. Análise da sobrevida global de acordo com a localização do tumor.

Tabela 24. Análise da sobrevida global de acordo com o tipo histológico do tumor.

Sobrevida		
Tipo histológico	5 anos	10 anos
Osteoblástico	35%	18%
Condroblástico	68%	61%

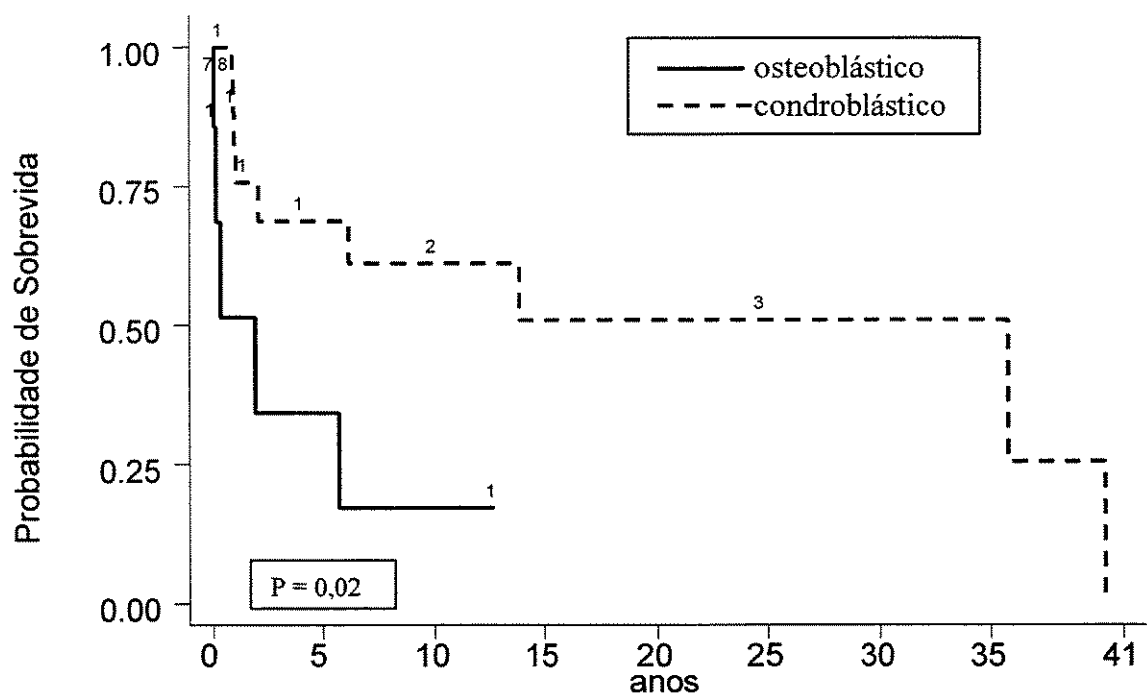


Gráfico 23. Análise da sobrevida global de acordo com o tipo histológico do tumor.

Tabela 25. Análise da sobrevida global de acordo com o grau de malignidade do tumor.

Sobrevida		
Grau de malignidade	5 anos	10 anos
Baixo	100%	0%
Intermediário	55%	44%
Alto	61%	61%

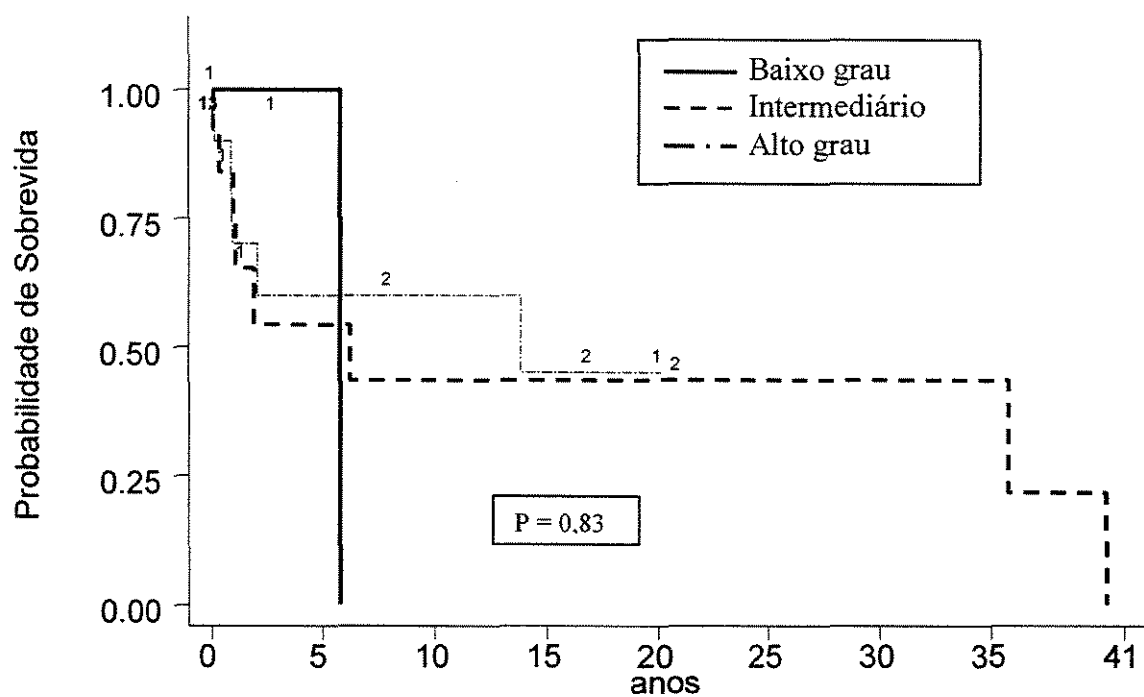


Gráfico 24. Análise da sobrevida global de acordo com o grau de malignidade do tumor.

Tabela 26. Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica para P53.

Sobrevida		
P53	5 anos	10 anos
Negativo	70%	60%
Positivo	52%	39%

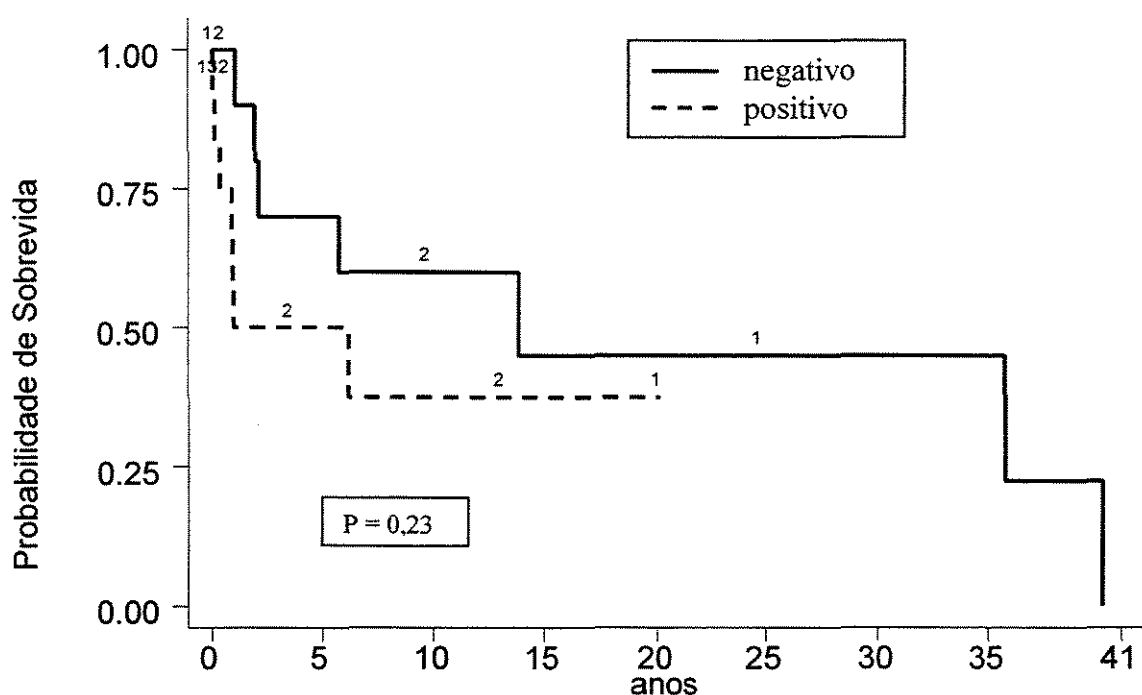


Gráfico 25. Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica para P53.

Tabela 27. Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica para CDK4.

Sobrevida		
CDK4	5 anos	10 anos
Negativo	100%	100%
Positivo	50%	36%

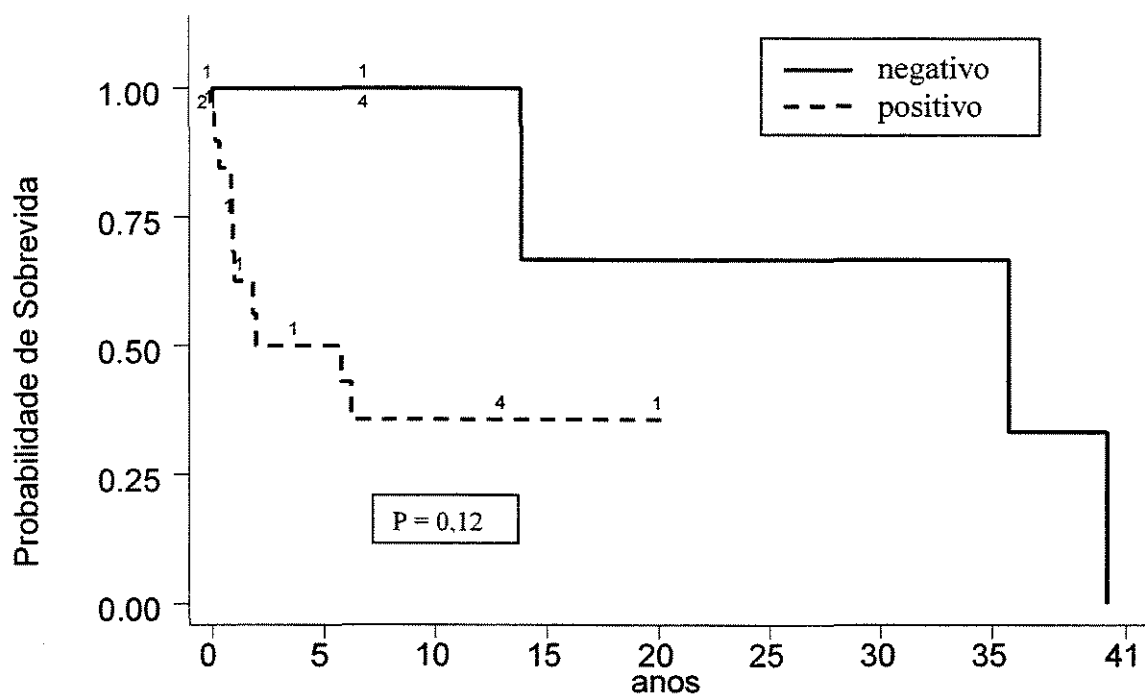


Gráfico 26. Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica para CDK4.

Tabela 28. Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica para PCNA.

Sobrevida		
PCNA	5 anos	10 anos
Negativo	100%	100%
Positivo	55%	43%

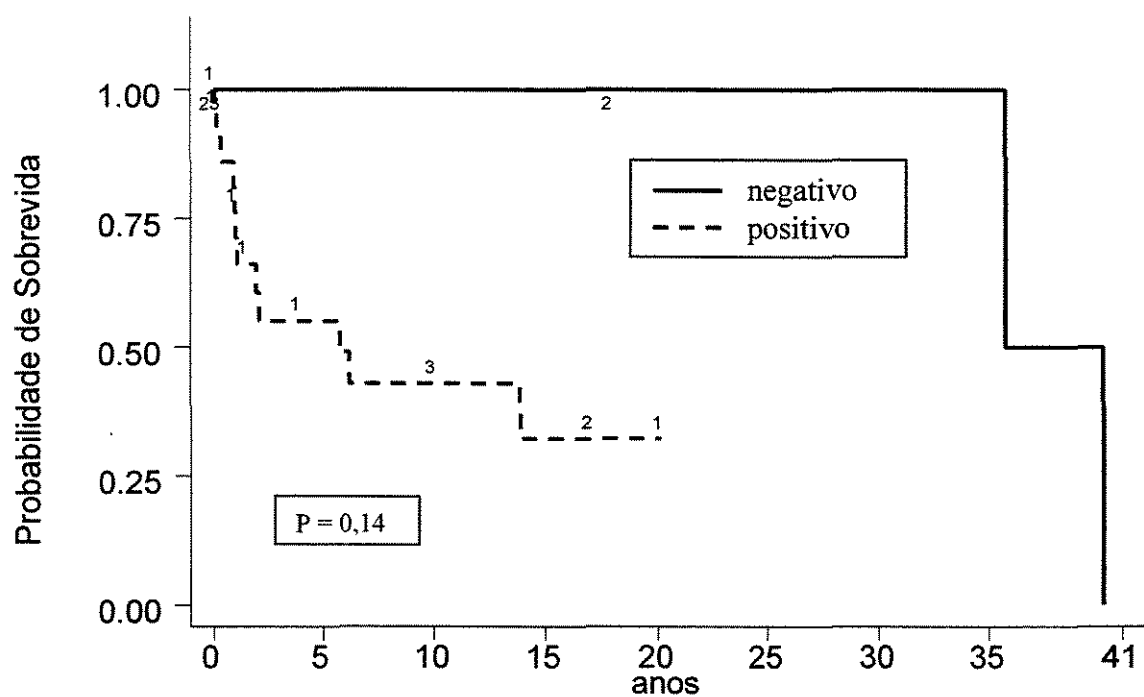


Gráfico 27. Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica para PCNA.

Tabela 29. Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica para Ki67.

Sobrevida		
Ki67	5 anos	10 anos
Negativo	100%	100%
Positivo	53%	40%

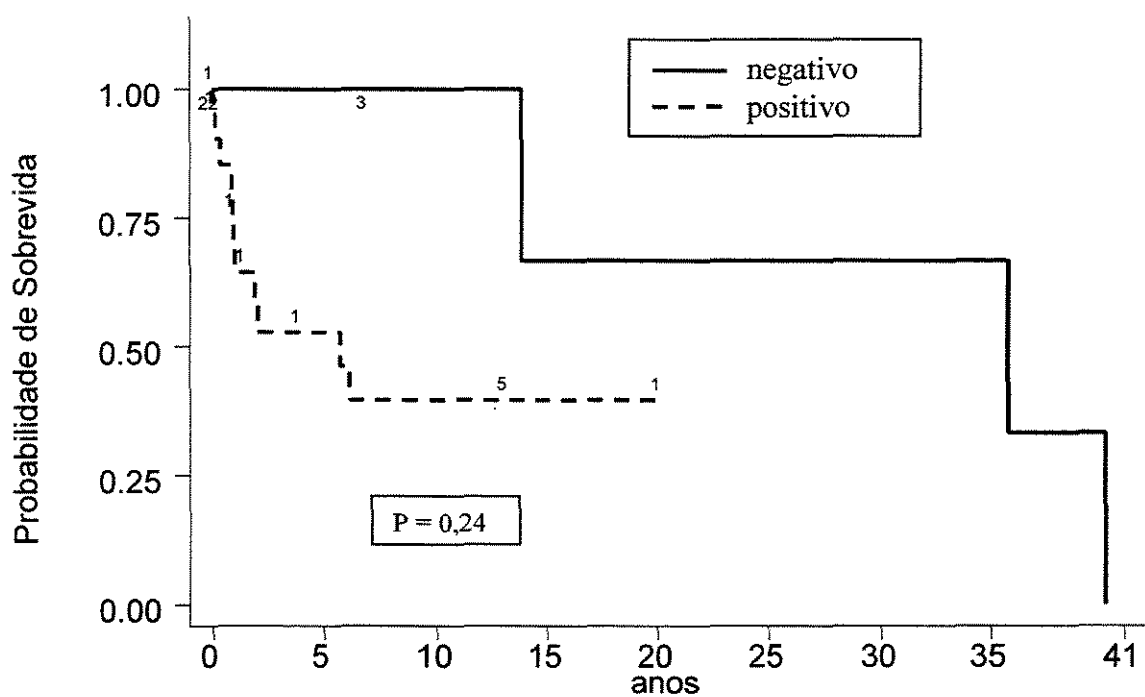


Gráfico 28. Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica para Ki67.

Tabela 30. Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica para MDM2.

MDM2	Sobrevida	
	5 anos	10 anos
Negativo	58%	45%
Positivo	63%	63%

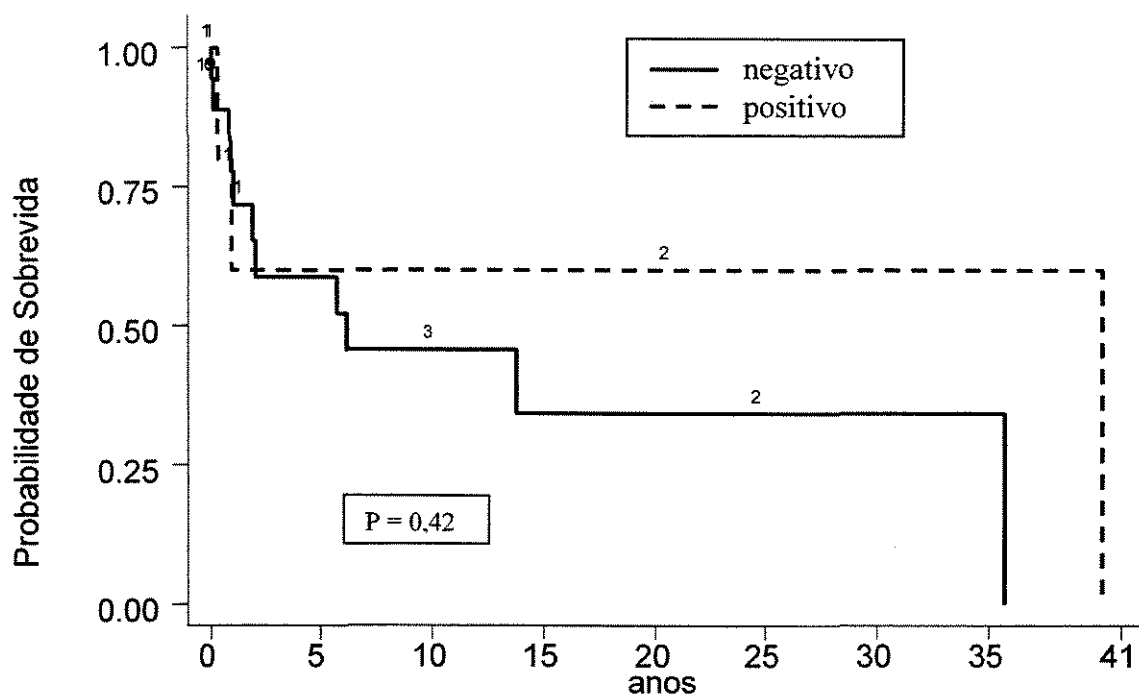


Gráfico 29. Análise da sobrevida global de acordo com a marcação imunohistoquímica para MDM2.

Tabela 31. Análise da sobrevida global de acordo com o tratamento realizado.

Sobrevida		
Tratamento	5 anos	10 anos
Cir	86%	72%
Cir + Qt	38%	25%
Cir + Rxt ou Cir + Qt + Rxt	75%	75%
Outras	0%	0%

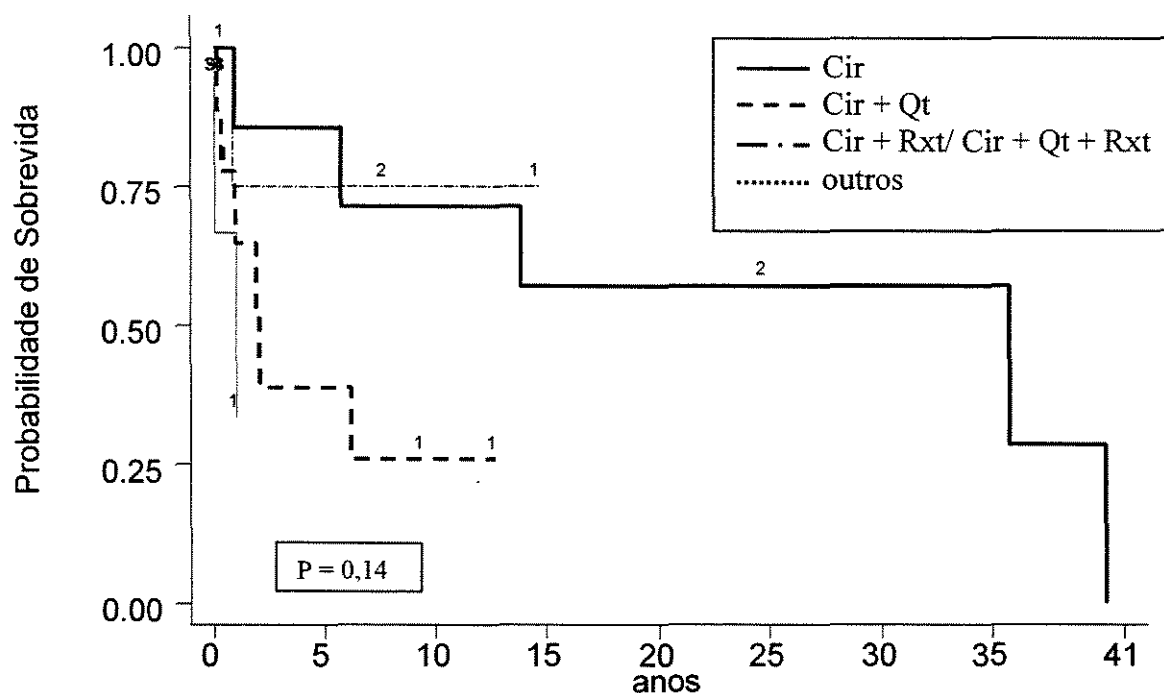


Gráfico 30. Análise da sobrevida global de acordo com o tratamento realizado.

Tabela 32. Análise da sobrevida global de acordo com a recorrência local.

Recorrência local	Sobrevida	
	5 anos	10 anos
Não	71%	57%
Sim	20%	20%

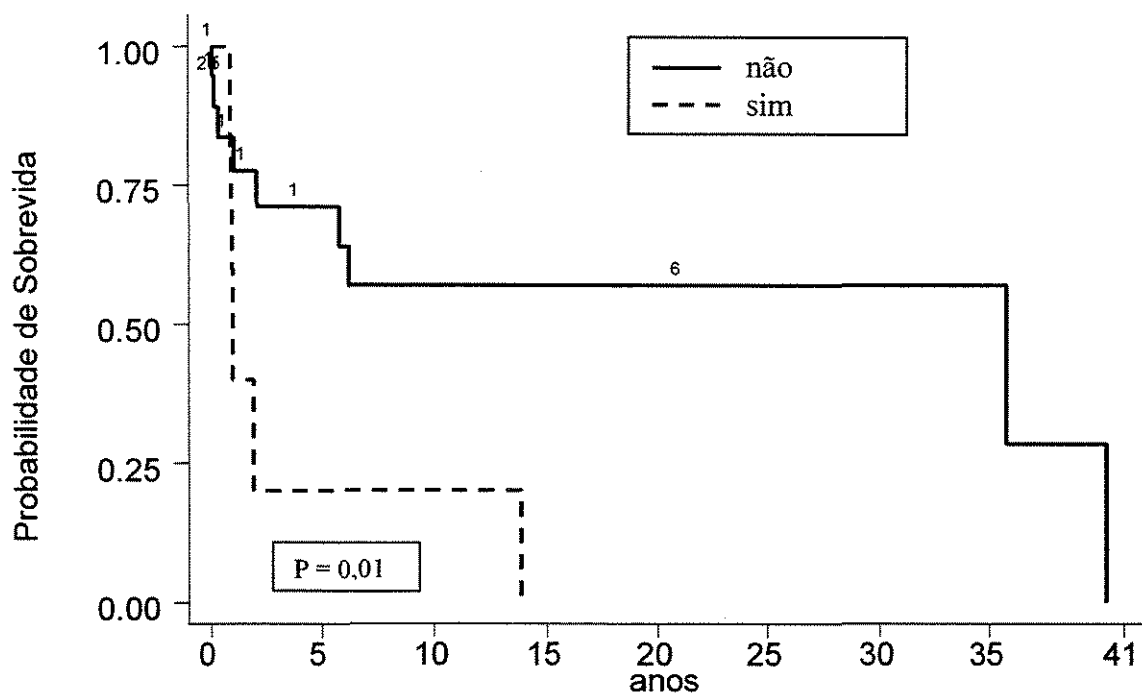


Gráfico 31. Análise da sobrevida global de acordo com a recorrência local.

Tabela 33. Análise da sobrevida global de acordo com a metástase à distância.

Sobrevida		
Metástase à distância	5 anos	10 anos
Não	62%	55%
Sim	50%	25%

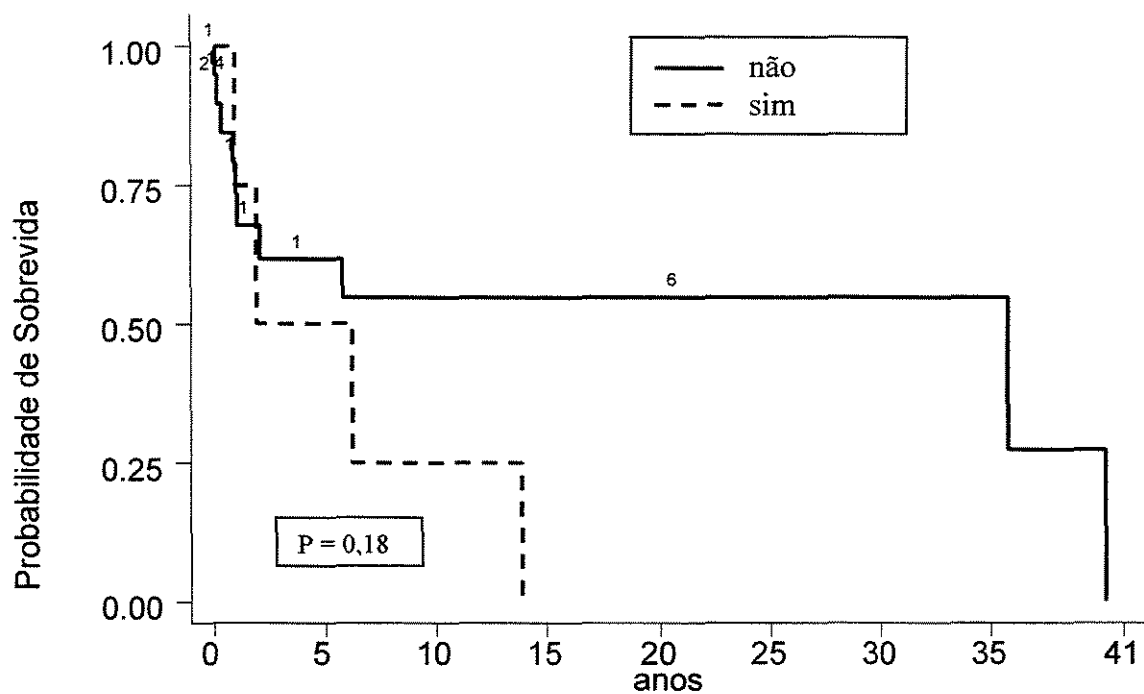


Gráfico 32. Análise da sobrevida global de acordo com a metástase à distância.

6. Discussão

A ocorrência de osteossarcomas na região de cabeça e pescoço é rara, correspondendo a cerca de 10% de todos os osteossarcomas (HUVOS, 1991; VEGE et al., 1991). Devido a raridade do tumor e a pequena quantidade de trabalhos publicados na literatura, o comportamento desses tumores nesta região ainda é pouco conhecido (SMEELE et al., 1997).

A maioria dos estudos retrospectivos de osteossarcomas de cabeça e pescoço analisaram uma média de 20 pacientes (MARK et al., 1991; ODA et al., 1997; CHINDIA et al., 1998; HA et al., 1999; MARDINGER et al., 2001). No entanto, a maioria dos trabalhos descreve as características clinicopatológicas sendo poucos os estudos que analisam a expressão imunohistoquímica de proteínas em osteossarcomas de cabeça e pescoço. Em nosso estudo, selecionamos 25 osteossarcomas da região de cabeça e pescoço atendidos no departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. do Câncer Camargo – São Paulo.

A distribuição de ocorrência dos osteossarcomas de cabeça e pescoço entre os gêneros é bastante variada. Alguns autores relatam predominância de ocorrência nos homens (CLARK et al., 1983; AUGUST et al., 1997; DOVAL et al., 1997; KASSIR et al., 1997; ODA et al., 1997; VAN ES et al., 1997; MARDINGER et al., 2001). Outros autores como TANZAWA et al. (1991) e LOPES et al. (2001) encontraram predominância no gênero feminino, com 60% e 66% dos casos, respectivamente. Por outro lado, MARK et al. (1991), HA et al. (1999) e BENNETT et al. (2000), observaram uma distribuição similar entre os gêneros. Em nosso estudo houve uma discreta predominância no gênero feminino, correspondendo a 52% dos casos.

O osteossarcoma da região de cabeça e pescoço acomete pacientes em idade mais avançada em relação àqueles que afetam ossos longos (DELGADO et al., 1994). A maioria dos estudos relataram faixa etária em torno de 35 anos para pacientes com osteossarcoma na região de cabeça e pescoço (TANZAWA et al., 1991; AUGUST et al., 1997; KASSIR et al., 1997; ODA et al., 1997; HÁ et al., 1999; BENNETT et al., 2000; GORSKY & EPSTEIN, 2000; MARDINGER et al., 2001). Outros autores observaram uma média de idade menor, em torno de 28 anos (MARK et al., 1991; DELGADO et al., 1994; DOVAL et al., 1997; VAN ES et al., 1997). No nosso estudo, a média de idade foi de 29 anos, assemelhando-se aos trabalhos que descrevem média de idade discretamente inferior a 30 anos.

A maioria dos trabalhos relatam uma predominância de ocorrência na mandíbula, seguido pela maxila (MARK et al., 1991; TANZAWA et al., 1991; KASSIR et al., 1997; ODA et al., 1997; BENNETT et al., 2000). Os outros ossos craniofaciais que também são acometidos pelo osteossarcoma são o temporal, frontal, parietal, occipital, orbital, zigomático e processo mastóide (MARK et al., 1991; HÁ et al., 1999). No nosso estudo, maior frequência também foi observada na mandíbula (60%) seguido pela maxila (36%). Em apenas 1 caso (4%) o tumor não se localizava em mandíbula ou maxila, acometendo a vértebra cervical.

No trabalho de VEGE et al. (1991) o tamanho médio dos tumores foi de 8,7 cm, com uma variação de 4 a 22 cm. Por outro lado, LOPES et al. (2001) encontraram números menores, com uma média de 2,83 cm. Em nosso estudo, o tamanho médio dos tumores foi de 6,81 cm, com uma variação de 3 a 15 cm.

É citado na literatura o desenvolvimento de osteossarcoma em pacientes que receberam radioterapia para o tratamento de outras doenças (GARRINGTON et al., 1967;

GOORIN et al., 1985; UNNI et al., 1996). No entanto, nessa situação o osteossarcoma geralmente ocorre alguns anos após a realização da radioterapia. UNNI & DAHLIN (1989) relataram que o período médio entre a radioterapia e o desenvolvimento do tumor foi de 13 anos. Outras condições pré-existentes como doença de Paget, retinoblastoma, displasia fibrosa e trauma, também têm sido relacionadas ao desenvolvimento do tumor. Em nosso estudo, 3 pacientes (12%) apresentaram condição pré-existente. Todos correspondiam à radioterapia prévia e o tempo médio entre o tratamento radioterápico e o desenvolvimento do tumor foi de 14 anos.

Histologicamente, os osteossarcomas podem ser classificados em osteoblásticos, condroblásticos e fibroblásticos, segundo as características do estroma. Na região de cabeça e pescoço, o tipo condroblástico tem sido descrito como predominante (CLARK et al., 1983; VEGE et al., 1991; DELGADO et al., 1994; MARDINGER et al., 2001). Por outro lado, outros autores como AUGUST et al. (1997), ODA et al. (1997) e HA et al. (1999) observaram predominância do tipo osteoblástico. Já o tipo fibroblástico ocorre raramente na região de cabeça e pescoço. DELGADO et al. (1994) relataram que apenas 4% dos osteossarcomas foram classificados como fibroblástico e DOVAL et al. (1997) não observaram nenhum caso em suas respectivas séries. Em nosso estudo a maioria dos casos (72%) foram classificados como do tipo condroblástico, seguido pelo osteoblástico (28%) e nenhum caso foi classificado como fibroblástico.

A maioria dos trabalhos de osteossarcomas de cabeça e pescoço mostra uma predominância pelos tumores de alto grau de malignidade (ODA et al., 1997; HA et al., 1999; MARDINGER et al., 2001). Outros, como DELGADO et al. (1994) e AUGUST et al. (1997), encontraram uma porcentagem maior de casos de grau intermediário. Os osteossarcomas de baixo grau de malignidade são raros, representando

1,9% dos casos do osteossarcomas da Mayo Clinic (DAHLIN & UNNI, 1986). Em nosso estudo, a maioria dos casos (60%) foi classificado como de grau intermediário e apenas 1 caso foi classificado como de baixo grau.

O p53 é um gene supressor de tumor que codifica uma proteína com função de impedir a propagação das células geneticamente danificadas (LEVINE, 1997). Mutações no gene p53 são encontradas em praticamente qualquer tipo de tumor maligno, inclusive o osteossarcoma (WADAYAMA et al., 1993; MOUSSES et al., 1996). Inúmeras técnicas podem ser utilizadas para avaliar a proteína p53, contudo a mais utilizada é a reação de imunohistoquímica (AGARWAL et al., 1999). OLIVEIRA et al. (1997) encontraram 47,5% de positividade imunohistoquímica para p53 em estudo de 17 casos de osteossarcomas de mandíbula e maxila. Por outro lado, LOPES et al. (2001), também estudando osteossarcomas de cabeça e pescoço, observaram 88% de casos positivos. Em estudos de osteossarcomas de ossos longos, a positividade para a p53 varia de 20% a 60% (MILLER et al., 1990; TOGUUCHIDA et al., 1992; UEDA et al., 1993; WADAYAMA et al., 1993; MOUSSES et al., 1996). Treze de 25 casos (52%) apresentaram positividade para a proteína p53 no nosso estudo.

Os genes MDM2 e CDK4 estão presentes na região q13-15 do cromossomo 12, e têm sido encontrados alterados em osteossarcomas (MILLER et al., 1996; KANOE et al., 1998). O MDM2 tem a função de regular negativamente a proteína do gene supressor de tumor p53. WANG et al. (1997) encontraram positividade imunohistoquímica em 30% dos casos de osteossarcomas e ZHOU et al. (1997) encontraram 41,7% dos casos positivos. GAMBERI et al. (2000), estudando osteossarcomas parosteais, observaram que a maioria dos casos (60%) foi negativo para a proteína MDM2. No entanto, em estudo de osteossarcomas de cabeça e pescoço, LOPES et al. (2000), encontraram 55% dos casos

positivos para MDM2. Em nosso trabalho, apenas 6 casos (24%) apresentaram positividade para MDM2, sendo que em nenhum deles foi observada positividade forte.

A proteína do gene CDK4 tem a função de fosforilar e inativar a proteína do retinoblastoma (Rb) em associação com a ciclina D (MATSUSHIME et al., 1994). A proteína Rb ativa regula a saída da célula da fase G1. Desta forma, a função do CDK4 deve ser considerada como a de ativar o ciclo celular através da inativação da proteína Rb (EWEN et al., 1993; KATO et al., 1993; MATSUSHIME et al., 1994; KANOE et al., 1998). Sendo o CDK4 o responsável pela fosforilação e inativação da proteína do gene supressor de tumor do retinoblastoma (pRb), que lidera a célula na progressão do ciclo celular, alterações no CDK4 podem resultar na perda de controle dos sinais regulatórios do ciclo celular normal, resultando numa proliferação celular desordenada (KANOE et al., 1998). BENASSI et al. (1999), estudando osteossarcomas de alto grau de malignidade, relataram que 74% dos casos foram positivos para CDK4. LOPES et al. (2001) observaram 88% dos casos positivos para CDK4 em osteossarcomas de cabeça e pescoço. Em estudo de osteossarcomas parosteais, GAMBERI et al. (2000) encontraram 92% dos casos positivos para CDK4, sendo que 60% deles foram considerados fortemente positivos. Em nosso estudo, 21 casos (84%) apresentaram positividade imunohistoquímica para a proteína do gene CDK4, sendo que 10 foram consideradas fortemente positivas (+ de 50% das células marcadas).

O PCNA é um antígeno nuclear de proliferação celular, sendo que a taxa de síntese dessa proteína está diretamente relacionada com o índice de células em proliferação. PARK & PARK (1995) encontraram alta positividade imunohistoquímica (mais de 40% das células tumorais marcadas) para PCNA em 35,3% de 34 casos de osteossarcomas, sendo mais freqüente no subtipo fibroblástico. CHANO et al. (1996), observaram uma maior

positividade para PCNA em áreas osteoblásticas em comparação com as áreas condroblásticas dos osteossarcomas. No nosso estudo, observamos uma porcentagem bem maior de positividade imunohistoquímica para PCNA, onde 92% dos casos apresentaram marcação.

O Ki-67, assim como o PCNA, é um antígeno presente somente em células em proliferação (GERDES et al., 1984; BRUNO & DARZYNKIEWICZ, 1992). PARK & PARK (1995) observaram apenas positividade fraca (menos de 10% das células tumorais marcadas) para o Ki-67 através de imunohistoquímica, em 64,7% dos casos de osteossarcomas. Em nosso estudo, 88% dos casos foram positivos para Ki67.

As grandes diferenças entre as porcentagens das marcações imunohistoquímicas encontradas na literatura podem ser devidas à variações de técnica das reações como: tempo de incubação com os anticorpos, processo de recuperação antigênica, marca do anticorpo utilizado, métodos de fixação e descalcificação dos tecidos entre outros.

O tratamento de escolha para os osteossarcomas da região de cabeça e pescoço é a ressecção cirúrgica radical com amplas margens de segurança (GARRINGTON et al., 1967; CLARK et al., 1983; FORTEZA et al., 1986; MARK et al., 1991). Entretanto, o uso da quimioterapia tem sido descritas como importante no tratamento de osteossarcomas de ossos longos. Porém, o uso de terapias adjuvantes no tratamento de osteossarcomas da região de cabeça e pescoço é ainda controverso (KASSIR et al., 1997; SMEELE et al., 1997). BENNETT et al. (2000) observaram que 18 dos 25 pacientes analisados haviam sido tratados por cirurgia. Já ODA et al. (1997) observaram que todos os 13 pacientes estudados sofreram remoção cirúrgica do tumor, sendo que 2 casos em associação com quimioterapia e 5 com quimioterapia e radioterapia. Além disso, estes autores observaram que apesar de não apresentar melhora estatisticamente significativa na sobrevida, a quimioterapia pré-

operatória faz com que a ressecção cirúrgica do tumor seja facilitada, pois diminui a extensão do tumor primário. No nosso estudo, foram obtidas informações referentes ao tratamento de 24 dos 25 pacientes. Destes, 21 foram tratados através da remoção cirúrgica do tumor, sendo que em 9 casos em associação com a quimioterapia, em 1 com a radioterapia e em 3 com a associação da quimioterapia e a radioterapia. Um caso foi tratado apenas com a quimioterapia, outro apenas com a radioterapia e outro com a associação da quimioterapia com a radioterapia.

A principal complicação do osteossarcoma na região de cabeça e pescoço é a recorrência local (BERTONI et al., 1991). DELGADO et al. (1994) e KASSIR et al. (1997) relataram que cerca de 50% dos pacientes apresentaram recorrência local. De acordo com a localização do tumor, o índice de recorrência varia de 39% a 70% quando na mandíbula, 13% a 53% na maxila e 59% a 75% quando em outros locais (CARON et al., 1971; RUSS & JESSE, 1980; VEGE et al., 1991). Em nosso estudo, 5 pacientes (20%) apresentaram recorrência local, cerca de 8 meses após o tratamento. Em 60% desses pacientes, o tumor estava localizado na maxila e os outros 40% na mandíbula. Sendo que dois desses pacientes haviam sido tratados apenas por cirurgia, outros dois com a associação da cirurgia com a quimioterapia e outro com a associação da cirurgia com a quimioterapia e a radioterapia.

As metástases de osteossarcomas de cabeça e pescoço são raras se comparadas com os tumores localizados em ossos longos, principalmente nos estágios iniciais da doença (VEGE et al., 1991). BENNETT et al. (2000) observaram que apenas 2 casos apresentaram metástases, sendo ambos para os pulmões. Já VAN ES et al. (1997) encontraram um número maior, 10 casos de um total de 48, sendo 8 deles para os pulmões e os demais para outros ossos e linfonodos regionais. Dentre os 25 casos estudados no nosso trabalho, apenas 4 (16%) apresentaram metástases, todos eles para os pulmões, sendo que em um caso, além

dos pulmões, outros órgãos também se encontravam afetados. Apenas 1 caso apresentou metástase no momento do diagnóstico, para os linfonodos regionais.

O índice de sobrevida global dos pacientes com osteossarcoma de cabeça e pescoço varia entre 12% a 69% em 5 anos, sendo que a maioria dos pacientes que evoluem para óbito, morrem antes de 5 anos após o início do tratamento (MARK et al., 1991; SMEELE et al., 1994; DOVAL et al., 1997; HA et al., 1999). A porcentagem de pacientes vivos no estudo de HA et al. (1999) após 5 anos de seguimento foi de 55%. Por outro lado, MARK et al. (1991) e DOVAL et al. (1997) observaram um índice de sobrevida em 5 anos de apenas 47% e 37,4%, respectivamente. Outros autores encontraram valores maiores, como ODA et al. (1997) com 77% após 5 anos e VAN ES et al. (1997) com 65% em 5 anos e 59% em 10 anos. Em nosso estudo, o índice de sobrevida em 5 anos foi de 59%, reduzindo para 49% em 10 anos.

Segundo AUGUST et al. (1997) quanto mais velho for o paciente acometido pelo osteossarcoma na região de cabeça e pescoço, menor a taxa de sobrevida. SMEELE et al. (1994) também relataram um menor índice de sobrevida em pacientes com mais de 35 anos de idade. No nosso estudo observamos um índice de sobrevida maior nos pacientes com mais de 24 anos em comparação com os demais. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

O local do tumor primário tem sido considerado como um importante fator associado ao prognóstico, visto que presume-se que os tumores que ocorrem na mandíbula podem ser ressecados mais facilmente (HA et al., 1999). KASSIR et al. (1997) mostraram uma maior sobrevida em pacientes com tumores localizados na mandíbula em comparação com os outros ossos craniofaciais. Alguns autores relataram que a região de sínfise mandibular é o local com o prognóstico mais favorável e o seio maxilar o menos favorável

(GARRINGTON et al., 1967). Por outro lado, outros autores não encontraram diferenças na sobrevida dos pacientes de acordo com a localização do tumor (AUGUST et al., 1997; HA et al., 1999). Em nosso estudo, apesar de observarmos um índice de sobrevida maior nos pacientes com tumores na mandíbula em relação à maxila, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Muitos autores consideraram o tamanho do tumor como um dos mais importantes fatores prognósticos, por estar diretamente relacionado com a maior possibilidade de se obter margens cirúrgicas livres (BERTONI et al., 1991; VEGE et al., 1991; DELGADO et al., 1994). Segundo estudo de DELGADO et al. (1994), o tamanho clínico do tumor foi o fator prognóstico mais importante, sendo que quanto maior o tumor, menor o tempo de sobrevida do paciente. Outros autores como BERTONI et al. (1991) e VEGE et al. (1991) também encontraram relação entre o tamanho do tumor e o tempo de sobrevida do paciente. No nosso estudo não houve correlação entre o tamanho do tumor e o prognóstico do paciente.

Segundo UNNI & DAHLIN (1989), os osteossarcomas que se desenvolvem em locais onde foram expostos à irradiação são geralmente de alto grau de malignidade tendo um pior prognóstico. No nosso trabalho, a maioria dos pacientes com história de radioterapia prévia para o tratamento de outro tumor evoluíram para óbito em menos de 5 anos de seguimento ($p = 0,004$).

CLARK et al. (1983) observaram que os pacientes com tumores do tipo condroblástico apresentavam uma maior sobrevida se comparados com os outros tipos. Por outro lado, outros autores relataram que os pacientes com tumores do tipo condroblástico em ossos longos, apresentavam um prognóstico desfavorável (NACHMAN et al., 1987; WOZNIAK et al., 1993). No entanto, a maioria dos outros estudos não conseguiu

correlacionar a sobrevida com o tipo histológico do tumor em osteossarcomas da região de cabeça e pescoço (AUGUST et al., 1997; DOVAL et al., 1997; HA et al., 1999). Em nosso estudo os pacientes com tumores do tipo condroblástico apresentaram uma taxa de sobrevida maior em relação aos do tipo osteoblástico, sendo a diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,02$).

BERTONI et al. (1991), DELGADO et al. (1994), KASSIR et al. (1997) e HA et al. (1999) relataram que os tumores de alto grau de malignidade representavam um prognóstico desfavorável ao paciente. Em nosso estudo, não houve correlação entre o grau de malignidade do tumor e o prognóstico dos pacientes.

LEONARDO et al. (1997) descreveram que a marcação imunohistoquímica para p53 ocorreu principalmente em tumores de pacientes com mais de 40 anos de idade. Neste mesmo estudo, observaram também que não houve diferenças na marcação para p53 em tumores de tipos histológicos diferentes. Assim como LEONARDO et al. (1997), no nosso estudo, a marcação para p53 foi maior em tumores de pacientes mais velhos, onde todos os casos com mais de 34 anos foram positivos ($p = 0,05$). Além disso, não se encontrou também diferenças na marcação entre tumores do tipo condroblástico e osteoblástico.

WADAYAMA, et al. (1993) e KAWAI et al. (1994) mostraram que a expressão imunohistoquímica do p53 estava associada com tumores de alto grau de malignidade e de comportamento agressivo, o que também foi constatado em nosso trabalho, onde 73% dos casos classificados como de alto grau de malignidade apresentaram positividade forte para p53. No entanto, assim como MILLER et al. (1990), TOGUCHIDA et al. (1992), UEDA et al. (1993), WADAYAMA et al. (1993) e MOUSSES et al. (1996), em nossa série não houve correlação estatisticamente significativa entre a marcação para p53 e o prognóstico do

paciente, mesmo tendo sido observado que os pacientes positivos para p53 tiveram um índice de sobrevida menor.

Estudos mostram que alterações no MDM2 e p53 normalmente não coexistem sugerindo que amplificação do MDM2 pode ser uma alternativa para a mutação no p53 durante a gênese dos tumores e progressão dos sarcomas (MOMAND et al., 1992; OLINER et al., 1992; LEACH et al., 1993; MELTZER, 1994). No nosso estudo não houve correlação entre a marcação para p53 e MDM2, onde apenas 4 casos (16%) foram positivos para esses dois marcadores ao mesmo tempo.

A amplificação do gene MDM2 tem sido associada com recorrência ou metástase de osteossarcomas (LANDANYI et al., 1993), e segundo LEACH et al. (1993) e MARCHETTI et al. (1995), na maioria dos casos, a amplificação do gene MDM2 é acompanhada pela superexpressão de sua proteína. No nosso estudo não verificamos a amplificação gênica, apenas a sua expressão, e observamos o inverso, onde todos os pacientes que apresentaram metástase e 80% dos que apresentaram recorrência local foram negativos para MDM2.

BENASSI et al. (1999) relacionaram CDK4 com um prognóstico desfavorável em pacientes com osteossarcomas. No nosso estudo observamos que todos os pacientes negativos para CDK4 estavam vivos em 10 anos de seguimento, sendo que dentre os casos positivos, o índice de sobrevida foi de apenas 36% no mesmo período de tempo. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

O aumento da atividade proliferativa é um importante indicador da agressividade de lesões malignas (GOMES et al., 2000). No nosso estudo observamos que todos os casos classificados como de alto grau de malignidade e todos os que apresentaram recorrência local foram positivos para PCNA.

Uma correlação significativamente alta entre a média de crescimento celular com o Ki-67 e características histopatológicas de malignidade têm sido relatados (ZHU et al., 1999). No nosso trabalho observamos que 91% dos casos de alto grau de malignidade foram positivos para Ki67. Além disso, verificamos que tanto para PCNA quanto para Ki67, todos os pacientes com tumores negativos para esses dois marcadores estavam vivos após 10 anos de seguimento, sendo que o índice de sobrevida dos casos positivos foi de apenas 39% no mesmo período de tempo. Assim como era esperado, houve uma correlação positiva entre a marcação para PCNA e Ki67 ($p = 0,0002$), uma vez que ambos são marcadores de proliferação celular.

Para investigar a possibilidade de correlação entre p53 e a atividade proliferativa, LEONARDO et al. (1997) comparou a marcação entre p53 e Ki67 (MIB-1) em osteossarcomas de ossos longos, não encontrando relação entre esses dois marcadores. No nosso estudo também não houve associação estatisticamente significativa entre a marcação para Ki67 e p53.

O fator mais importante associado à sobrevida é a adequada remoção cirúrgica do tumor primário (DOVAL et al., 1997). Segundo o trabalho de SMEELE et al. (1997), os pacientes tratados através da associação da cirurgia com a quimioterapia apresentaram uma melhor sobrevida em relação aos outros. No entanto, segundo KASSIR et al. (1997), não houve diferença na sobrevida entre pacientes tratados apenas por cirurgia ou em associação com terapias adjuvantes. No nosso trabalho, não houve correlação entre o tipo de tratamento realizado e o prognóstico do paciente. Observamos também que todos os casos em que não foi feita a remoção cirúrgica do tumor, provavelmente pelo tumor estar em um estágio muito avançado, tornando-se irressecável, os pacientes evoluíram para óbito em menos de 5 anos.

Os pacientes que desenvolvem recorrência local apresentam um prognóstico bastante desfavorável (RAYMOND et al., 1989; SMEELE et al., 1994; HA et al., 1999). Em nosso estudo, 5 pacientes (20%) apresentaram recorrência local, sendo que todos eles evoluíram para óbito em menos de 5 anos após o início do tratamento ($p = 0,03$), mostrando ser este um importante fator relacionado à sobrevida. DELGADO et al. (1994) mostraram também que os casos que apresentaram recorrência local, os tumores primários tinham mais de 10 cm. Esta relação entre o tamanho do tumor e a recorrência local não foi observada no nosso estudo.

A presença de metástase reduz a taxa de sobrevida em 10 anos a praticamente zero (BATSAKIS et al., 1980). Em nossa série, 3 dos 4 pacientes que desenvolveram metástase evoluíram para óbito, mostrando ser este também, um importante fator relacionado ao prognóstico.

7. Conclusões

1. A média de idade dos pacientes com osteossarcomas de cabeça e pescoço foi de 29 anos com uma discreta predileção no gênero feminino. O local mais acometido foi a mandíbula e a média do tamanho dos tumores foi 6,81cm.
2. O tipo histológico predominante foi o condroblástico e a grande maioria foi de grau de malignidade intermediário.
3. A positividade imunohistoquímica foi observada em 52% dos casos para p53, 24% para MDM2, 84% para CDK4, 92% para PCNA e 88% para Ki67.
4. A principal forma de tratamento foi a cirurgia e em alguns casos em associação com a quimioterapia e/ou radioterapia. Cinco pacientes (20%) apresentaram recorrência local e 4 (16%) desenvolveram metástase.
5. A análise de correlação de frequência mostrou que os pacientes que desenvolveram recorrência local e metástase tiveram pior prognóstico. Outras características clínicas e histopatológicas não tiveram relação com o prognóstico. Os marcadores imunohistoquímicos p53, MDM2, CDK4, PCNA e Ki67 também não tiveram relação com o prognóstico, apesar de termos observado que os pacientes negativos para CDK4, PCNA e Ki67 tiveram um tempo de sobrevida maior em relação aos pacientes positivos para esses marcadores.
6. A sobrevida global foi de 59% em 5 anos e 49% em 10 anos e os fatores mais importantes relacionados com a sobrevida foram a história de radioterapia prévia, tumores do tipo osteoblástico e presença de recorrência local.

Referências Bibliográficas

1. Agarwal S, Mathur M, Srivastava A, Ralhan R. MDM2/p53 co-expression in oral premalignant and malignant lesions: potential prognostic implications. *Oral Oncol* 1999;35:209-216.
2. Antman K, Eilber FR, Shiu MH. Soft tissue sarcomas: current trends in diagnosis and management. *Curr Prob Cancer* 1989;13:337-67.
3. August M, Magennis P, Dewitt D. Osteogenic Sarcoma of the jaws: factors influencing prognosis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997;26:198-204.
4. Baas IO, Mulder JR, Offerhaus GJA, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol* 1994;172:5-12.
5. Batsakis JB, Solomon AR, Rice DH. The Pathology of Head and Neck Tumors: Neoplasms of Cartilage, Bone and Notochord. *Head and Neck Surg* 1980;3:43-57.
6. Batsakis JG. Osteogenic and chondrogenic sarcomas of the jaws. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987;96:474-475.
7. Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, Ragazzini P, Sollazzo MR, Merli M. Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma. *Int J Cancer* 1999;84:489-493.
8. Bennett JH, Thomas G, Evans AW, Speith PM. Osteosarcoma of the jaws: A 30-year retrospective review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2000;90:323-333.
9. Bennett JE, Tignor SP, Shafer WG. Osteogenic Sarcoma of the Facial Bones. *Am J Surg* 1968;116:538.

10. Bentzen SM, Poulsen HS, Kaae S, Jensen OM, Johansen H, Mouridsen HT, Daugaard S, Arnoldi C. Prognostic factors in osteosarcomas. A regression analysis. *Cancer* 1988;62:194-202.
11. Bertoni F, Dallera P, Bacchini Para, Marchetti C, Campobassi A. The Instituto Rizzoli-Beretta experience with osteosarcoma of the jaw. *Cancer* 1991;68:1555-1563.
12. Bieling P, Rehan N, Winkler P, Helmke K, Maas R, Fuchs N, Bielack S, Heise U, Jurgens H, Treuner J, Romanowski R, Exner U, Kotz R, Winkler K. Tumor size and prognosis in aggressively treated osteosarcoma. *J Clin Oncol* 1996;14:848-858.
13. Bonadona G, della Cuna GR. Osteosarcoma. In: Bonadona G, Robustelli della Cuna G, editors. *Handbook of Medical Oncology*. Milano: Masson S.P.A, Milano, 1988. P. 708-718.
14. Bosari S, Viale G. The clinical significance of p53 aberrations in human tumors. *Virchows Arch* 1995;427:229-241.
15. Bramwell VHC. The role of chemotherapy on osteosarcoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;20:61-85.
16. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990;17:489-503
17. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992;25:31-40.
18. Caron AS, Hadju SI, Strong EW. Osteogenic Sarcomas of the Facial and Cranial Bones. *Am J Surg* 1971;122:719-725.

19. Chambers RG, Mahoney WD. Osteogenic sarcoma of the mandible: current management. *Am J Surg* 1970;36:463-471.
20. Chano T, Ishizawa M, Matsumoto K, Morimoto S, Hukuda S, Okabe H. The identity of proliferating cells in bone tumors with cartilaginous components: evaluation by double-immunohistochemical staining using proliferating cell nuclear antigen and S-100 protein. *Eur J Histochem* 1995;39:21-30.
21. Chen YK, Lin LM. Radiographic changes to mandibular canal in osteogenic sarcoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;74:128.
22. Chen J, Brennan MF, Levine AJ. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1994;54:794-799.
23. Chindia ML. Osteosarcoma of the jaw bones. *Oral Oncology* 2001;37:545-547.
24. Clark JL, Unni KK, Dahlin DC, Devine KD. Osteosarcoma of the jaw. *Cancer* 1983;51:2311-2316.
25. Cohen IJ. Significant recent advances in the treatment of osteosarcoma. *Isr J Med Sci* 1993;29:748-775
26. Cordon-Cardo, C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Amer J Pathol* 1995;147:545-560.
27. Craft AW. Osteosarcoma and Chondrossarcoma. In: Voute PA, Barret A, Lemerle J, editors. *Cancer in children. Clinical management*. London: Springer-Verlag, 1992. P. 282-294.

28. Dahlin DC, Coventry MN. Osteogenic Sarcoma – A Study of Six Hundred Cases. *J Bone Joint Surg* 1967;49:101-110.
29. Dahlin DC. Malignant Bone tumors: improvement in survival. *Mayo Clin Proc* 1988;63:414-415.
30. Davis AM, Bell RS, Goodwin PJ. Prognostic Factors in Osteosarcoma: A Critical Review. *J Clin Oncol* 1994;12:423-431.
31. Defries CHO, Perlin CE, Liebel AS. Treatment of osteosarcoma of the mandible. *Arch Otolaryngol* 1979;105:538-559.
32. Delgado R, Maafs E, Alfeiran A, Mohar A, Barrera JL, Zinser J, Beltran A. Osteosarcoma of the jaw. *Head Neck* 1994;16:246-252.
33. Dickens P, Wei WI, Sham JST. Osteosarcoma of the maxilla in Hong Kong. Chinese postirradiation for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1990;66:1924-1926.
34. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors. *Nature* 1992;356:215-221.
35. Dorfman HD, Czerniak B. Bone tumors. St. Louis: Mosby; 1998.
36. Doval DC, Kumar RV, Kannan V, Sabitha KS, Misra S, Kumar V, Hegde P, Bapsy PP, Mani K, Shenoy AM, Kumarswamy SV. Osteosarcoma of the jaw bones. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1997;35:357-362.
37. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-754

38. Eliber FR, Rosen G. Adjuvant chemotherapy of osteosarcoma. *Semin Oncol* 1989;16:312-23.
39. Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. *Cell*. 1993a, 73, 487-497.
40. Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Picci P, Giacomini S, Longhi A, Bacci G. Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: Na analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute. *Annals of Oncology*. 2001;12:1145-1150.
41. Finkelstein JB. Osteosarcoma of Jaw Bones. *Radiol Clin North Am* 8:425-443, 1970.
42. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine J. Activating mutation for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988;8:531-539.
43. Florenes VA, Maelandsmo GM, Forus A, Andreassen A, Myklebost O, Fodstad O. MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *J Natl Cancer Instit* 1994;86:1297-1302.
44. Forteza G, Colmenero B, Lopez-Barea F. Osteogenic Sarcoma of the maxilla and mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986;62:179-184.
45. Frassica FJ, Sim FH, Frassica DA, Wold LE. Survival and management considerations in postirradiation osteosarcomas and Paget's osteosarcomas. *Clin Orthopaed Rel Res* 1991;270:120-127.
46. Fu YS, Perzin KH. Non-Epithelial Tumors of the Nasal Cavity, Paranasal Sinuses, and Nasopharynx: A Clinical Pathologic Study. II. Osseous and Fibro-Osseous Lesions, Including Osteoma, Fibrous Dysplasia, Ossifying Fibroma, Osteoblastoma, Giant Cell Tumor, and Osteosarcoma. *Cancer* 1974;33:1289-1305.

47. Gamberi G, Ragazzini P, Benassi MS, Ferrari C, Sollazzo MR, Molendini L, Merli M, Magagnoli G, Ruggieri P, Balladelli A, Orlando C, Bacchini P, Pazzagli M, Picci P. Analysis of 12q13-15 genes in parosteal osteosarcoma. *Clin Orthop* 2000;377:195-204.
48. Garrington GE, Scofield HH, Cornyn J. Osteosarcoma of the jaws: analysis of 56 cases. *Cancer*. 1967;20:377-391.
49. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-1715.
50. Geschickter CF, Copeland MM. Parosteal osteoma of bone: A new entity. *Ann Surg* 1951;133:790-806.
51. Gomes APN, Araújo VC, Pinto Jr DS. Avaliação imuno-histoquímica de p53 e PCNA como marcadores de risco para lesões bucais potencialmente malignas. *RPG Rev Pós Grad* 2000;7:349-355.
52. Goorin AM, Abelson HT, Frei E. Osteosarcoma: fifteen years later. *N Engl J Med*. 1985;313:1637-1643.
53. Gorsky M, Epstein JB. Craniofacial osseous and chondromatous sarcomas in British Columbia – a review of 34 cases. *Oral Oncology*. 2000;36:27-31.
54. Greenberg DB, Goorin A, Gebhardt MC, Gupta L, Stier N, Harmon D, Mankin H. Quality of life in osteosarcoma survivors. *Oncology (Huntingt)* 1994;8:19-25.
55. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-4878.

56. Ha PK, Eisele DW, Frassica FJ, Zahurak ML, McCarthy EF. Osteosarcoma of the head and neck: a review of Johns Hopkins experience. *Laryngoscope* 1999;109:964-969.
57. Hall M, Peters G. Genetics alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996;68:67-107.
58. He J, Olson JJ, James CD: Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines. *Cancer Res* 1995;55:4833-4836.
59. High CL, Frew Jr AL, Glass RT. Osteosarcoma of the mandible. *Oral Surg* 1978;45:678-684.
60. Hoffman S, Jacoway JR, Krolls SO. Malignant odontogenic tumors of the jaws. In: *Intraosseous and parosteal tumors of the jaws. Atlas of tumor pathology. 2nd series, Fascicle 24, AFIP Washington DC; 1987. P. 170-180.*
61. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253:49-53.
62. Huang WY, Coltrera M, Schubert M, Morton T, Truelove E. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:748-754.
63. Huvos AG. Bone tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders 1991:88-156
64. Jaffe N. Current concepts in the management of disseminated malignant bone disease in childhood. *Can J Surg* 1977;20:537-539.

65. Jones SN, Sands AT, Hancock A. The tumorigenic potential and cell growth characteristics of p53-deficient cells are equivalent in the presence or absence of MDM2. *Proceedings of National Academy of Science of United States Of America* 1996;93:106-111.
66. Kanoe H, Nakayama T, Murakami H, Hosaka T, Yamamoto H, Nakashima Y, Tsuboyama T, Nakamura T, Sasaki MS, Toguchida J. Amplification of the CDK4 Gene in Sacomas: Tumor Specificity and Relationship with the RB Gene Mutation. *Anticanc Res* 1998;18:2317-2322.
67. Kassir RR, Rassekh CH, Kinsella JB, Segas J, Carrau RL, Hokanson JA. Osteosarcoma of the Head and Neck: Meta-analysis of Nonrandomized Studies. *Laryngoscope* 1997;107:56-61.
68. Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME and Sherr CJ. *Genes Dev.*1993;7: 331-342.
69. Kawai A, Noguchi M, Beppu Y, Yokoyama R, Hirohashi S, et al. Nuclear immunoreaction of p53 protein in soft tissue sarcomas: a possible prognostic factor. *Cancer* 1994;73:2499-2505.
70. Kragh LV, David CD, Erich JB. Osteogenic Sarcoma of the Jaws and Facial Bones. *Am J Surg* 1958;96:496-505.
71. Ladanyi M, Cha C, Lewis R, Jhanwar SC, Huvos AG, Healey JH. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 1993;53:16-8.
72. Lanzkowsky P. Malignant bone tumors In: Redner A, editor. *Manual of pediatric hematology and oncology*, 3rd ed. London: Academic Press, 2000. p. 555-570.

73. Lavigueur A, Maltby V, Mock D, Rossant J, Pawson T, Bernstein A. High incidence of lung, bone and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. *Mol Cell Biol* 1989;9:3982-3991.
74. Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B. p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993;53:2231-2234.
75. Leonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M. p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathological features and proliferative rate. *Cancer* 1997;79:1541-1547.
76. Levine AJ. The p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1992;326:1350-1351.
77. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323.
78. Lichtenstein L, Jaffe HL. Chondrosarcoma of bone. *Am J Pathol* 1943;19:553-589.
79. Lindqvist C, Teppo L, Sane J, Holmstrom T, Wolf J. Osteosarcoma of the mandible: analysis of nine cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1986;44:759-764.
80. Livolsi VA. Osteosarcoma of the maxilla. *Arch Otolaryngol* 1977;103:485-488.
81. Lopes MA, Nikitakis NG, Ord RA, Sauk Jr J. Amplification and protein expression of chromosome 12q13-15 genes in osteosarcomas of the jaws. *Oral Oncology* 2001;37:566-571.
82. Lowry WB, McKee EE. Primary Osteogenic Sarcoma of the Heart. *Cancer* 1972;30:1068-1073.

83. Maelandsmo GM, Berner JM, Florenes VA, Forus A, Hovig E, Fodstad O, Myklebost O. Homozygous deletion frequency and expression levels of CDKN2 gene in human sarcomas – relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. *Brit J Cancer* 1995;72:393-398.
84. Malawer MM, Link MP, Donaldson LL. Sarcomas of the bone. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg AS, eds. *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1989:1442-1453.
85. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233-1238.
86. Mardinger O, Givol N, Talmi Y, Taicher S. Osteosarcoma of the jaw: The Chaim Sheba Medical Center experience. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;9:445-451.
87. Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Merlo G, Chella A, Angeletti CA, Bevilacqua G. mdm2 gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in the absence of p53 gene mutations. *Diagn Mol Pathol*. 1995;4:93-97.
88. Mark KJ, Sercarz JA, Tran L, Dodd LG, Selch M, Calcaterra TC. Osteosarcoma of the head and neck. The UCLA experience . *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;117:761-766.
89. Mark RJ, Poen J, Tran LM, Fu YS, Selch MT, Parker RG. Post-irradiation sarcomas. A single-institution study and review of the literature. *Cancer* 1994;73:2653-2662.
90. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1994;14: 2066-2076.

91. McCann AH, Kirley A, Carney DN, Corbally N, Magee HM, Keating G, Dervan PA. Amplification of the MDM2 gene in human breast cancer and its association with MDM2 and p53 protein status. *Br J Cancer*. 1995;71:981-985.
92. McCormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 1992;21:591-594.
93. Meltzer PS, Jankowski AS, Dal Cin P, Sandberg AA, Paz IB, Coccia MA. Identification and cloning of a novel amplified DNA sequence in human malignant fibrous histiocytoma derived from a region of chromosome 12 frequently rearranged in soft tissue tumors. *Cell Growth Differ* 1991;2:495-501.
94. Meltzer PS. MDM2 and p53: a question of balance. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1265-1266.
95. Miller CW, Aslo A, Tsay C, Slamon D, Ishizaki K, Toguchida J, Yamamuro T, Lampkin B, Koeffler HP. Frequency and structure of p53 rearrangements in human osteosarcoma. *Cancer Res* 1990;50:7950-7954.
96. Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978;121:2228-2234.
97. Moll UM, Schramm LM. p53 - an acrobat in tumorigenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:23-37.
98. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George DL, Levine AJ. The mdm2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53 mediated transactivation. *Cell* 1992;69:1237-1245.
99. Momand J, Zambetti GP. Mdm-2: "big brother" of p53. *J Cell Biochem*. 1997;64:343-352.

101. Mousses S, McAuley L, Bell RS, Kandel R, Andrulis IL. Molecular and immunohistochemical identification of p53 alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Mod Pathol* 1996;9:1-6.
102. Murat J, Hutten N, Crassas Y. Sarcoma Osteogenique de la vessie. *J Chir* 1975;36:73-75.
103. Murti PR, Warnakulasuriya KA, Johnson NW, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Mehta FS. p53 expression in buccal precancer as a marker for malignant potential. *J Oral Pathol Med* 1998;27:191-196.
104. Nachman J, Simon MA, Dean L, Shermeta D, Dawson P, Vogelzang NJ. Disparate histological responses in simultaneously resected primary and metastatic osteosarcoma following intravenous neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 1987;5:1185-1190.
105. Nakayama T, Toguchida J, Wadayama B, Kanoe H, Kotoura Y, Sasaki MS. MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with tumor progression in differentiated adipose tissue tumors. *Int J Cancer* 1996;64:342-346.
106. Nawa G, Ueda T, Mori S, Yoshikawa H, Fukuda H, Ishiguro S, Funai H, Uchida A. Prognostic significance of Ki67 (MIB1) proliferation index and p53 over-expression in chondrosarcomas. *Int J Cancer* 1996;69:86-91.
107. Newland JR, Ayala AG. Parosteal osteosarcoma of the maxilla. *Oral Surg* 1977;43:727-733.
108. Nicholson HS, Mulvihill JJ. Late effects of therapy in survivors of childhood and adolescent osteosarcoma. *Cancer Treat Res* 1993;62:45-48.
109. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumor types. *Nature* 1989;342:707.

110. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000;29:413-425.
111. Oda D, Bavisotto LM, Schmidt RA, McNutt M, Bruckner JD, Conrad III EU, Weymuller EA Jr. Head and Neck Osteosarcoma at the University of Washington. *Head and Neck* 1997;19:513-523.
112. Okada K, Unni KK, Swee RG, Sim FH. High grade surface osteosarcoma: a clinicopathologic study of 4 cases. *Cancer* 1999;85:1044-1054.
113. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992;358:80-83.
114. Oliveira P, Nogueira M, Pinto A, Almeida O. Analysis of p53 Expression in Osteosarcoma of the Jaw: Correlation with Clinicopathologic and DNA Ploidy Findings. *Human Pathol* 1997;28:1361-1365.
115. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* 1992;11:961-971.
116. Park HR, Park YK. Expression of p53 protein, PCNA, and Ki-67 in osteosarcomas of bone. *J Korean Med Sci* 1995;10:360-367.
117. Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J. International variations in the incidence of childhood bone tumors. *Int J Cancer* 1993;53:371-376
118. Pease GL, Maisel RH, Cantrell RW. Surgical management of osteogenic sarcoma of the mandible. *Arch Otolaryngol* 1975;101:761-762.

119. Petrikowski CG, Pharoah MJ, Lee L, Grace MGA. Radiographic differentiation of osteogenic sarcoma, osteomyelitis, and fibrous dysplasia of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:744-750.
120. Piette J, Neel H, Maréchal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene* 1997;15:1001-1010.
121. Porter PL, Gown AM, Kramp SG, Coltrera MD. Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. *Am J Pathol* 1992;140:1453.
122. Pratt CB, Champion JE, Fleming ID, Rao B, Kumar AP, Evans WE, Green AA, George S. Adjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremity: long term results of two consecutive prospective protocol studies. *Cancer* 1990;65:439-445.
123. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999;187:112-126.
124. Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990;160:93-102.
125. Raymond AK, Spires J, Ayala A, Chawla S, Lee YY, Benjamin RS. Osteosarcoma of head and neck. *Lab Invest* 1989;60:76
126. Raubenheimer EJ, Noffke CE. Low-grade ontraosseous osteosarcoma of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86:82-85.
127. Regezi JA, Zarbo RJ, McClatchey KD, Courtney RM, Crissman JD. Osateosarcomas and chondrosarcomas of the jaws: Immunohistochemical correlations. *Oral Surg* 1987;64:302-307.

128. Reyes JM, Vangore SK, Putong PB, Harwick R, Miller AS, Chen SY. Osteogenic sarcoma of the tongue. *Oral Surg* 1981;51:421-425.
129. Rosen G, Caparros B, Huvos AG, Kosloff C, Nirenberg A, Cacavio A, Marcove RC, Lane JM, Mehta B, Urban C. Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer* 1982;49:1221-1230.
130. Russ JE, Jesse H. Management of osteosarcoma of the maxilla and mandible. *Am J Surg* 1980;140:572-576.
131. Ryan RF, Eisenstant S, Shambaugh EM. Osteogenic sarcoma of the mandible: a plea for radical initial surgery. *Plast Reconstr Surg* 1986;78:41-44.
132. Salvati M, Ciapetta R, Raco A. Osteosarcomas of the skull: clinical remarks on 19 cases. *Cancer* 1993;71:2210-2216.
133. Setzen M, Sobol S, Toomey JM. Clinical course of unusual malignant sarcomas of head and neck. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1979;88:486-494.
134. Slootweg PJ, Muller H. Osteosarcoma of the jaw bones: analysis of 18 cases. *J Max-fac Surg* 1985;13:158-166.
135. Smeele LE, Van Der Waal JE, Diest PJ, Van Der Waal I, Snow GB. Radical surgical treatment in craniofacial osteosarcoma gives excellent survival: a retrospective cohort study of 14 patients. *Oral Oncol Eur J Cancer* 1994;30B:374-376.
136. Smeele LE, Kostensen PJ, van der Waal I, Snow GB. Effect of Chemotherapy on Survival of Craniofacial Osteosarcoma: A Systematic Review of 201 Patients. *J Clin Oncol* 1997;15:363-367.

137. Spjut HJ, Dorfman HD, Fechner RE, Ackerman LV: Tumors of bone and cartilage. Fasc. 5, Washington, 1971, Armed Forces Institute of Pathology.
138. Tanzawa H, Uchiyama S, Sato K. Statistical observation of osteosarcoma of the maxillofacial region in Japan. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;72:444-448.
139. Toguchida J, Yagamuchi T, Ritchie B, Beauchamp RL, Dayton SH, Herrera GE. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 1992;52:6194-6199.
140. Toschi L, Bravo R. Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *J Cell Biol* 1988;107:1623-1628.
141. Tran LM, Mark R, Meier MD, Calcaterra TC, Parker RG. Sarcomas of the head and neck: prognostic factors and treatment strategies. *Cancer* 1992;70:169-177.
142. Ueda Y, Dockhorn-Dworniczack B, Blasius S, Mellin W, Wuisman P, Bocker W. Analysis of mutant p53 protein in osteosarcomas and other malignant and benign lesions of bone. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:172-178.
143. Unni KK. Dahlin's bone tumors, general aspects and data on 11,087 cases. 5th ed. Philadelphia: Lippincot-Raven; 1996.
144. Unni KK, Dahlin DC. Osteosarcoma: Pathology and Classification. *Seminars in Roentgenology* 1989;24:143-152.
145. Van Es RJJ, Keus RB, van der Wall I, Koole R, Vermey A. Osteosarcoma of the jaw bones. Long-term follow up of 48 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997;26:191-197.

146. Vege DS, Borges AM, Aggrawal K, Balasubramaniam G, Parikh DM, Bhaser B. Osteosarcoma of the craniofacial bones. A clinico-pathological study. *J Craniomaxillofac Surg* 1991;19:90-93.
147. Wadayama B, Toguchida J, Yamagichi T, Sasaki MS, Yamamuro T. p53 expression and its relationship to DNA alterations in bone and soft tissue sarcomas. *Br J Cancer* 1993;68:1134-1139.
148. Wanebo HJ, Koness RJ, MacFarlane JK, Eilber FR, Byers RM, Elias EG, Spiro RH. Head and neck sarcoma : report of the Head and Neck Sarcoma Registry. Societ of Head and Neck Surgeons Committee on Research. *Head Neck* 1992;14:1-7.
149. Wang X, Wang S, Feng C. Detection of p53 and MDM2 gene expression in osteosarcoma with biotin-labelled in situ. *Chang Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih* 1997;35:178-180.
150. Wilner D: Radiology of bone tumors and allied disorders, ed. 3, Philadelphia, 1982, W.B. Saunders Company, pp. 2083-2095.
151. Whelan JS. Osteosarcoma. *Eur J Cancer* 1997;33:1611-1619.
152. Wozniak W, Rychlowska M, Liebhart M, Klepacka T, Poznanska A. Preliminary estimation of prognostic factors in osteosarcoma in children on the basis of treatment results. *Med Paed Oncol* 1993;21:596.
153. Wunder JS, Eppert K, Burrow SR, Gogkoz N, Bell RS, Andrulis IL. Co-amplification and overexpression of CDK4, SAS and MDM2 occurs frequently in human parosteal osteosarcomas. *Oncogene* 1999;18:783-788.
154. Xiao ZX, Chen J, Levine A, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 1995;375:694-698.

155. Yagan R, Radivoyevitch M, Bellon EM. Involvement of the mandibular canal: Early sign of osteogenic sarcoma of the mandible. 1985;60:56-60.
156. Zhou X, Gao L, Zhe X. Alterations of MDM2 and p53 genes in bone tumors. Chang Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih 1997;26:270-272.
157. Zhu Q, Tipoe GL, White FH. Proliferative activity as detected by immunostaining with Ki67 and proliferating cell nuclear antigen in benign and malignant epithelial lesions of the human parotid gland. Anal Quant Cytol Histol 1999;21:336-342.

9. Anexos

9.1. Anexo 1

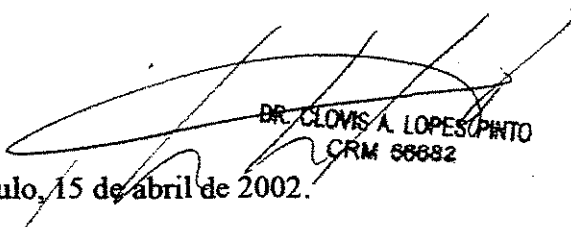
Cópia da ficha utilizada para a coleta das informações clínicas dos pacientes.

9.2. Anexo 2

Cópia da autorização concedida pelo responsável pelo arquivo de blocos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo - São Paulo para a retirada dos blocos parafinados.

Autorização

Autorizo o Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes e o aluno de pós-graduação Ademar Takahama Junior, ambos do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, a utilizarem os blocos de parafina dos pacientes diagnosticados com osteossarcoma da região de cabeça e pescoço, os quais encontram-se arquivados no departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer - A.C. Camargo, para o desenvolvimento de estudos envolvendo imunohistoquímica e PCR.



DR. CLOVIS A. LOPES PINTO
CRM 58882

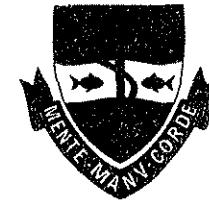
São Paulo, 15 de abril de 2002.

9.3. Anexo 3

Cópia do certificado de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CERTIFICADO

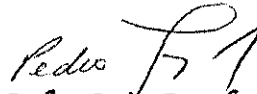


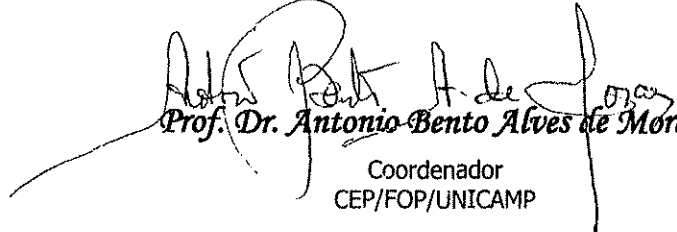
Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Análise Clínicopatológica e Imunohistoquímica de Osteossarcomas de Cabeça e Pescoço", sob o protocolo nº **012/2002**, do Pesquisador **Ademar Takahama Junior**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 07 de maio de 2002

We certify that the research project with title "Clinicopathological and Immunohistochemical Analysis of Osteosarcomas of the Head and Neck", protocol nº **012/2002**, by Researcher **Ademar Takahama Junior**, responsibility by Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Resarch at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, May 07 2002


Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP