



1150048924



FOP

T/UNICAMP L881a

MÁRCIO AJUDARTE LOPES

**Análises histopatológica e imunohistoquímica e amplificação de DNA
através de Real-Time PCR em carcinoma espinocelular de
cavidade oral e em osteossarcoma dos maxilares**

**Conjunto de três trabalhos científicos
apresentado para obtenção do Título de
Livre Docente junto a Área de
Semiologia do Departamento de
Diagnóstico Oral da Faculdade de
Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.**

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

**PIRACICABA-SP
2001**

1929

DEDICATÓRIA

À minha esposa Sílvia e à minha filha Marina.

Aos meus pais Maria e Antonio, meu irmão Fábio e
minha irmã Fernanda.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa do Diretor Prof. Dr.
Antonio Wilson Sallum.

Ao Prof. Dr. Oswaldo Di Hipólito Júnior, responsável pela Área de Semiologia
da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, responsável pela Área de Patologia da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski, diretor do Departamento de Cirurgia de
Cabeça e Pescoço do Hospital do Câncer, A.C. Camargo.

Aos Profs. Drs. Jacks Jorge Júnior, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta e Pablo
Agustin Vargas da Área de Patologia da Faculdade de Odontologia de
Piracicaba-UNICAMP.

Aos Profs. John Joseph Sauk, Bernard Levy, Mark Reynolds, Robert Ord e Remy
Blanchaert da Universidade de Maryland, Estados Unidos.

À todos que contribuíram para a minha formação e desenvolvimento deste
trabalho.

SUMÁRIO

1- Marcadores de metástase linfonodal em carcinoma espinocelular de cavidade oral

Resumo	01
Abstract	03
Introdução	04
Materiais e métodos	07
Pacientes	07
Análise histopatológica	07
Análise imunohistoquímica	08
Análise estatística	10
Resultados	14
Análise histopatológica	14
Análise imunohistoquímica	15
Discussão	19

2- Hsp47 e Catepsina L: amplificação e expressão de proteínas em carcinoma espinocelular com múltiplos linfonodos regionais metastáticos

Resumo	23
Abstract	25
Introdução	27
Materiais e métodos	30
Pacientes	30
Análise histopatológica	30
Análise imunohistoquímica	31
Extração de DNA	32
Amplificação de DNA (Real-Time PCR)	34
Análise estatística.....	36
Resultados	39
Análise histopatológica	39
Análise imunohistoquímica	39
Amplificação de DNA (Real-Time PCR)	40
Discussão	44

3- Amplificação e expressão de proteínas dos genes da região q13-15 do cromossomo 12 em osteossarcomas dos maxilares

Resumo	49
Abstract	51
Introdução	53
Materiais e métodos	56
Pacientes	56
Análise histopatológica	56
Análise imunohistoquímica	56
Extração de DNA	58
Amplificação de DNA (Real-Time PCR)	60
Resultados	62
Discussão	67
Referências bibliográficas	73

1- Marcadores de metástase linfonodal em carcinoma espinocelular de cavidade oral

Resumo

A habilidade do carcinoma espinocelular de cavidade oral de metastatizar para linfonodos nem sempre está relacionada ao estágio clínico. O objetivo deste estudo foi identificar marcadores histopatológicos e/ou moleculares associados ao desenvolvimento de metástase linfonodal analisando dois grupos clínicos extremos. (A) pacientes com tumores primários pequenos (T1, T2) com linfonodos metastáticos e (B) pacientes com tumores primários grandes (T3, T4) sem metástase regional compuseram os grupos estudados. Comparações entre os grupos foram realizadas com o teste Mann-Whitney e associações entre as variáveis foram avaliadas usando testes correlacionais paramétricos e não-paramétricos. Grau de queratinização foi significativamente menor em tumores primários com linfonodos metastáticos ($p \leq 0,01$). Grau de queratinização estava associado significativamente com pleomorfismo nuclear ($p = 0,02$), número de mitoses ($p = 0,02$), estágio de invasão ($p = 0,002$), e expressão de p53 ($p = 0,04$), independentemente do estágio clínico do tumor. Outras características

microscópicas e marcadores imunohistoquímicos não foram diferentes entre os grupos ($p > 0,05$). Estes dados indicam que ainda não há um fator superior ao grau de queratinização para identificar pacientes de alto risco para desenvolvimento de metástase regional.

Abstract

The ability of oral squamous cell carcinoma to metastasize to lymph nodes does not always show a relationship with clinical staging. The aim of this study was an attempt to define a trend for predictive histopathological and/or molecular biomarkers for the development of nodal metastasis analyzing two clinical extremes groups. (A) patients with small primary tumors (T1, T2) with lymph node metastasis and (B) patients with large primary tumors (T3, T4) without metastatic disease composed the group study. Group comparisons were made using a Mann-Whitney test, and associations among variables were assessed using nonparametric and parametric correlational analyses. Degree of keratinization was significantly less in primary tumors with lymph node metastasis ($p \leq 0.01$). Degree of keratinization was associated significantly with nuclear pleomorphism ($p = 0.02$), number of mitoses ($p = 0.02$), stage of invasion ($p = 0.002$), and p-53 expression ($p = 0.04$), independent of clinical stage of tumor. Other microscopic features and immunohistochemical markers did not differ significantly between groups ($p > 0.05$). These data indicate that there is not yet a single predictive parameter superior to the degree of keratinization to identify patients at risk for the development of regional metastasis.

Introdução

O prognóstico do carcinoma espinocelular de cavidade oral é extremamente variado. Para facilitar o planejamento do tratamento e obter informações com relação ao prognóstico, estadiamento clínico usualmente é utilizado. O sistema de estadiamento clínico TNM tem sido adotado em todo o mundo tornando padronizado o critério para avaliar a extensão do tumor e facilitando desta forma trocas de informações entre instituições. Este sistema avalia o tamanho do tumor primário (T), o envolvimento de linfonodos regionais (N) e a presença de metástase à distância (M) (Hermanek & Sobin, 1987).

Normalmente pacientes com tumores avançados têm pior prognóstico, sendo a presença de metástase regional o mais importante indicador de sobrevida (Farr et al., 1980). Geralmente é aceito que pacientes com um único linfonodo ipsilateral positivo apresenta redução na sobrevida de 50% (Batsakis, 1979). O desenvolvimento de metástase linfonodal freqüentemente está relacionado com o tamanho do tumor primário. Tem sido demonstrado que carcinomas espinocelulares T1 de língua e T1 de assoalho bucal apresentam linfonodos positivos em 14% e 11% dos casos, respectivamente; enquanto T4 de língua e T4 de assoalho bucal manifestam prevalência de metástase cervical de 76,5% e

53,5% (Lindberg, 1972). Entretanto, paradoxalmente, pequenos tumores podem desenvolver doença no pescoço e terem um pobre prognóstico, e tumores primários grandes podem não desenvolver metástase em linfonodos e terem bom prognóstico.

Embora o TNM seja usado rotineiramente, não é sempre preciso em avaliar câncer de cabeça e pescoço, visto que este sistema apenas determina o tamanho e localização do tumor e não antecipa o potencial metastático. Além disso, o exame clínico pode identificar apenas metástase regional com acurácia de aproximadamente 70% (Bergman et al., 1994). Embora várias formas de exames de imagem como tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética e ultra-sonografia possam melhorar essa porcentagem, eles não detectam doença microscópica (Stern et al., 1990; van den Brekel et al., 1991; Wilson et al., 1994).

Com o objetivo de identificar tumores que desenvolverão metástase linfonodal, as características histopatológicas dos tumores primários têm sido avaliada. Entre as características investigadas, profundidade microscópica de invasão tem sido demonstrada correlacionar diretamente com metástase linfonodal (Ambrosch et al., 1995). Grau de diferenciação celular também tem

sido considerado como um importante fator prognóstico para prever metástase regional (Woolgar & Scott, 1995).

Durante a última década, vários marcadores moleculares têm sido investigados como possíveis indicadores de comportamento dos tumores. Entre esses genes, o p-53 é o mais comumente estudado, além de outros como o bcl-2, c-erbB-2 e PCNA. Embora vários estudos tenham investigado o potencial desses biomarcadores em carcinoma espinocelular de cavidade oral, não há um consenso de um marcador para prognóstico (Tsujimoto et al., 1985; Levine et al., 1994; Tsai & Jin, 1995).

Materiais e Métodos

Pacientes

Prontuários médicos de 315 pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral atendidos entre fevereiro de 1991 e julho de 1999 no Departamento de Cirurgia Oral e Maxilofacial, Universidade de Maryland, foram revistos. Dez pacientes com tumores primários pequenos e metástase regional (T1T2N+) e 10 pacientes com tumores primários avançados sem envolvimento de linfonodos (T3T4N0) foram selecionados para este estudo. Dados referentes a idade, sexo, raça, local do tumor, estágio T, estágio N, estágio M, tratamento, recorrência/metástase, seguimento e situação na última consulta foram registrados (Tabelas 1 e 2).

Análise histopatológica

As lâminas dos espécimes cirúrgicos foram revistas sem as informações clínicas. Os tumores foram classificados de acordo com o sistema proposto por Anneroth et al. (1987). Esta classificação apresenta seis itens: a) queratinização,

b) pleomorfismo nuclear, c) número de mitoses, d) padrão de invasão, e) estágio de invasão e f) infiltração linfo-plasmocitária. Cada tumor foi classificado seguindo um escala de 4 pontos de acordo com os itens descritos acima (Tabela 3). Os tumores foram também analisados de acordo com a profundidade de invasão em milímetros.

Análise imunohistoquímica

Foram realizados cortes de 5µm de espessura de tecidos incluídos em parafina e montados em slides de vidro. Os cortes foram desparafinados em 3 trocas de xilol (5, 5 e 2 minutos) seguidos de 2 trocas de 2 minutos cada em álcool etílico 100% e 95%. A reativação antigênica foi realizada colocando os cortes em um recipiente com solução citrato (Biogenex CA-USA, HK086-9K), e este recipiente foi colocado dentro de uma panela de pressão plástica, e todo esse conjunto foi colocado dentro do microondas.

Os cortes foram tratados em dois ciclos de 15 min cada, em potência máxima e potência 4, respectivamente. Atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3% e proteína não específica foi bloqueada com reagente bloqueador universal (Biogenex CA-USA, HK085-5K).

Os cortes foram posteriormente lavados com solução fosfato tamponado (PBS: phosphate-buffered saline) e incubados por 1 hora com os seguinte anticorpos primários:

- a) p-53 (Biogenex CA-USA, MU195-UC) 1:50
- b) PCNA (Dako A/S, Denmark, M0879) 1:50
- c) bcl-2 (Biogenex CA-USA, MU287-UC) 1:20
- d) c-erbB-2 (Dako S/A, Denmark, A0485) 1:200
- e) Hsp47 (StressGen, SPA-470) 1:1000
- f) EMS-1 (Upstate, p80/85) 1:500

Após 2 lavagens com PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário por 30 min (Biogenex CA-USA, HK268-UK), sendo posteriormente lavados 2 vezes com PBS. Complexo Estreptoavidina/biotina (Dako, Denmark, K0377) foi aplicado por 30 min e após 2 lavagens de 2 min cada com PBS, os cortes foram corados com diaminobenzidina (DAB) e contra-corados com hematoxilina de Harris.

A positividade da reação imunohistoquímica foi classificada como : - (negativo; positividade entre 0 e 5%), + (fraco; entre 5% e 25%), ++ (moderado; entre 25% e 50%), e +++ (forte; mais que 50% das células tumorais).

Análise estatística

Comparações entre os grupos foram realizadas usando o teste Mann-Whitney e associações entre as variáveis foram avaliadas usando análises paramétricas e não-paramétricas. Significância estatística foi estabelecida em 5% ($p \leq 0,05$).

Tabela 1. Distribuição dos pacientes T1 T2 N+ de acordo com os dados clínicos.

caso	idade	sexo	raça	local	T	N	M	tratamento	recorrência/ metástase	seguimento meses	situação
1	50	M	B	assoalho	1	0	0	RC+ESOH	pescoço	107	vivo
2	62	M	B	retromolar	1	1	0	RC+ECR+RXT	local	12	falecido
3	61	M	N	assoalho	2	2c	0	RC+ECRB+RXT	pescoço	8	falecido
4	78	M	B	retromolar	2	1	0	RC+ECR+RXT	não	53	vivo
5	60	M	B	língua	2	0	0	RC+ESOHb+ RXT	pescoço + pulmão	12	falecido
6	50	F	B	língua	2	1	0	RC+ESOHb+ RXT	não	26	vivo
7	73	F	B	assoalho	2	0	0	RC+ESOH	pescoço	22	vivo
8	60	M	B	língua	2	1	0	RC+ESOH+RXT	não	14	falecido*
9	52	M	B	assoalho	2	2b	0	RXT	residual	9	falecido
10	70	M	B	retromolar	2	1	0	RC+ECR+RXT	pulmão	36	falecido

*desenvolveu segundo tumor primário na cavidade oral

RC- ressecção cirúrgica, ESOH- esvaziamento supra-omo-hioideo, ESOHB- esvaziamento supra-omo-hioideo bilateral, ECR- esvaziamento cervical radical, ECRB- esvaziamento cervical radical bilateral, RXT- radioterapia

Tabela 2. Distribuição dos pacientes T3 T4 N0 de acordo com os dados clínicos.

caso	idade	sexo	raça	local	T	N	M	tratamento	recorrência/ metástase	seguimento meses	situação
1	67	M	N	assoalho	4	0	0	RC+ESOH+ECR+ RXT	não	99	vivo
2	75	F	B	assoalho	4	0	0	RC+ESOH+B+ RXT	local	30	falecido
3	61	M	B	retromolar	4	0	0	RC+ECR+RXT	não	63	vivo
4	66	M	B	língua	4	0	0	RC+ECR+RXT	pulmão	18	falecido
5	60	F	B	língua	3	0	0	RC+ESOH+B+ RXT	não	31	falecido*
6	35	M	N	língua	3	0	0	RC+ECR+RXT	pulmão	30	falecido
7	51	F	B	assoalho	4	0	0	RC+ESOH+ECR+ RXT	não	49	vivo
8	59	F	B	retromolar	4	0	0	RC+ECR+RXT	não	31	vivo
9	41	M	B	língua	3	0	0	RC+ECR+RXT	não	18	vivo
10	48	M	B	assoalho	4	0	0	RC+ESOH+ECR+ RXT	não	37	vivo

*morreu de causa não associada ao câncer

RC- ressecção cirúrgica, ESOH- esvaziamento supra-omo-hioideo, ESOHB- esvaziamento supra-omo-hioideo bilateral, ECR- esvaziamento cervical radical, ECRB- esvaziamento cervical radical bilateral, RXT- radioterapia

Tabela 3. Sistema para graduação da malignidade do carcinoma espinocelular de cavidade oral*.

Grau histológico de malignidade da população de células tumorais				
Parâmetro morfológico	1	2	3	4
Grau de queratinização	Altamente queratinizado (> 50% das células)	Moderadamente queratinizado (20 a 50% das células)	Pobrememente queratinizado (5 a 20% das células)	Não Queratinizado (0 a 5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pouco pleomorfismo nuclear (> 75% de células diferenciadas)	Moderadamente abundante pleomorfismo nuclear (50 a 75% de células diferenciadas)	Abundante pleomorfismo nuclear (25 a 50% de células diferenciadas)	Extremo pleomorfismo nuclear (0 a 25% de células diferenciadas)
Número de Mitoses	0 a 1	2 a 3	4 a 5	> 5

Grau histológico de malignidade da relação tumor-hospedeiro				
Parâmetro morfológico	1	2	3	4
Padrão de Invasão	Margens de infiltração bem delineadas	Margens infiltrativas em cordas ou bandas	Pequenos grupos ou cordas de células infiltrativas (n>15)	Acentuada e Dispersa Dissociação celular em pequenos grupos de células (n< 15) e/ou células isoladas
Estágio de Invasão	Carcinoma in situ e/ou questionável invasão	Invasão evidente, mas envolvendo somente lâmina própria	Invasão adjacente a músculos, glândulas salivares e periósteo	Extensiva invasão Envolvendo a maior parte do estroma e infiltrando osso
Infiltrado linfoplasmocitário	Acentuado	Moderado	Discreto	Ausente

* Anneroth et al. (1987).

Resultados

Análise histopatológica

O grau de queratinização foi alto (mais que 50% das células tumorais) em todos os 10 casos do grupo T3T4N0 (classificação 1). Entretanto, somente 5 tumores T1T2N+ apresentaram-se altamente queratinizado (classificação 1). Em outros 4 casos deste grupo, queratinização foi observada em 20 a 50% das células tumorais (classificação 2) e em 1 tumor (caso 10), menos que 20% das células eram queratinizadas (classificação 3). O grau de queratinização foi estatisticamente menor em tumores T1T2N+ comparados aos tumores T3T4N0 ($p=0,01$). Embora tumores T1T2N+ tiveram alta porcentagem de células com pleomorfismo celular, a diferença não foi estatisticamente significativa. O número de mitoses foi discretamente maior nos tumores T3T4N0 com 6 casos apresentando de 2 a 5 mitoses por campo (classificações 2 e 3). Nos tumores T1T2N+, esta característica foi observada em 4 casos. Entretanto, a diferença entre os grupos não foi significativa. Padrão de invasão foi mais infiltrativo nos tumores T1T2N+ mas sem diferença estatística. Estágio de invasão e infiltrado linfo-plasmocitário foram similares entre os grupos (Tabela 4). Analisando a

soma dos valores de todos os itens, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

A profundidade de invasão nos tumores T1T2N+ variou de 4 a 22mm (média de 9,9mm) enquanto nos tumores T3T4N0 variou de 6 a 23mm (média de 11,2mm). Embora a profundidade de invasão tenha sido menor em tumores T1T2N+, a diferença não foi significativa.

Análise imunohistoquímica

O número de casos classificados como +++ (positividade em mais que 50% das células tumorais) para p53 foi discretamente maior em tumores T1T2N+ em relação aos tumores T3T4M0, entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa. Dois padrões da expressão de bcl-2 foram analisados, nuclear e citoplasmático. Positividade nuclear e citoplasmática para o bcl-2 foi maior no grupo T1T2N+, mas não foi observada diferença estatística. PCNA foi alto nos dois grupos sem diferença estatística entre eles. A positividade do c-erbB-2 (membranoso e citoplasmático) foi discretamente maior em tumores T3T4N0, mas também não foram diferentes entre os grupos. Da mesma maneira,

as expressões de EMS-1 (membranoso e citoplasmático) e Hsp47 não foram diferentes entre os grupos T1T2N+ e T3T4N0 (Tabela 5).

Analisando associações entre as características histopatológicas e imunohistoquímicas, foi observado que o grau de queratinização estava associado significativamente com o pleomorfismo nuclear ($r=0,56$; $p=0,02$), número de mitoses ($r=0,55$; $p=0,02$), estágio de invasão ($r=0,70$; $p=0,002$), e expressão de p53 ($r=0,50$; $p=0,04$), independentemente do estágio clínico do tumor. Tumores que apresentaram-se altamente queratinizados tiveram menor pleomorfismo nuclear, menor número de mitoses, menor invasão e menor expressão de p53. Por outro lado, tumores com baixa porcentagem de células queratinizadas, tiveram maior pleomorfismo nuclear, maior número de mitoses, maior invasão e maior expressão de p53.

Na análise da associação das características clínicas e histopatológicas com recorrência, metástase e sobrevida, foi observado que pacientes com tumores que apresentaram recorrência, metástase regional ou à distância tiveram menor sobrevida ($r=0,73$; $p=0,00$). Recorrências foram observadas mais comumente em tumores T1T2N+ ($r=0,40$; $p=0,08$). Embora queratinização tenha sido diferente entre os grupos (T1/T2N+ e T3/T4N0) sendo maior em pacientes sem metástase linfonodal, esta característica não foi diretamente associada com

recorrência ou sobrevida. Entretanto, recorrência foi observada estar moderadamente associada a outras características histopatológicas: infiltração linfo-plasmocitária ($r=0,43$; $p=0,06$) e padrão de invasão ($r=0,40$; $p=0,08$).

Tabela 4. Distribuição dos grupos de acordo com as características histopatológicas.

Grupos	T1T2N+				T3T4N0				p*
Classificação	1	2	3	4	1	2	3	4	
Queratinização	5	4	1	0	10	0	0	0	0,01
Pleomorfismo nuclear	2	5	3	0	4	5	1	0	0,21
Número de mitoses	6	3	1	0	4	5	1	0	0,45
Padrão de invasão	0	1	7	2	0	0	10	0	0,54
Estágio de invasão	0	0	9	1	0	0	10	0	0,31
Infiltração linfo-plasmocitária	5	2	3	0	5	3	2	0	0,83

p* teste estatístico Mann-Whitney

Tabela 5. Distribuição dos grupos de acordo com a imunopositividade.

Grupos	T1T2N+				T3T4N0				P*
Classificação	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
p-53	0	5	0	5	0	6	2	2	0,39
Bcl-2 (nuclear)	0	3	3	4	0	4	4	2	0,42
Bcl-2 (citoplasmática)	0	3	1	6	0	4	4	2	0,19
PCNA	0	0	2	8	0	0	3	7	0,61
c-erbB-2 (membranosa)	0	2	2	6	0	0	2	8	0,26
c-erbB-2 (citoplasmática)	0	1	0	9	0	0	0	10	0,31
SEM-1 (membranosa)	0	2	6	2	0	3	3	4	0,74
SEM-1 (citoplasmática)	0	1	1	8	0	2	0	8	0,91
Hsp-47	0	2	2	6	0	2	6	2	0,19

p* teste estatístico Mann-Whitney

Discussão

Metástase cervical pode desenvolver independentemente do estágio clínico do tumor. Sendo assim, vários estudos têm analisado as características histopatológicas dos tumores primários com o objetivo de identificar fatores associados ao desenvolvimento de metástase linfonodal. Alguns estudos têm revelado correlação entre a espessura do tumor e o grau de malignidade com a prevalência de metástase regional (Ambrosch et al., 1995). Vários parâmetros histopatológicos como queratinização, padrão de invasão, invasão intravascular, invasão perineural e infiltração linfocítica têm sido descritos como fatores associados a metástase linfonodal (Anneroth et al., 1987; Umeda et al., 1992; Woolgar & Scott, 1995; Take et al., 1999).

Evidências conflitantes existem em relação a análise da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor como fatores associados ao prognóstico. A expressão de p-53, bcl-2, PCNA e c-erbB-2 tem sido reportada por alguns autores como não sendo associada ao estágio da doença, metástase linfonodal, recorrência ou sobrevida (Sommer & Olofsson, 1997; Gandour-Edwards et al., 1998) enquanto outros têm mostrado correlação desses marcadores com metástase cervical e sobrevida (Kaur et al., 1998; Staibano et al., 1998).

Na tentativa de observar uma possível correlação, dois grupos específicos de pacientes foram analisados: tumores primários grandes sem metástase regional e tumores pequenos com metástase em linfonodos cervicais. Os resultados mostraram que somente grau de queratinização foi estatisticamente diferente entre os dois grupos. Tumores localmente grandes sem metástase regional (T3/T4N0) geralmente foram altamente queratinizados em contraste com tumores pequenos com metástase linfonodal (T1/T2N+) que tiveram baixo grau de queratinização. Embora outras características histopatológicas não tenham sido estatisticamente diferentes entre os grupos, foi observado que pleomorfismo nuclear, número de mitoses e estágio de invasão foram associados significativamente com o menor grau de queratinização independentemente do estágio clínico dos tumores.

Análise imunohistoquímica de p-53, PCNA, bcl-2 e c-erbB-2 também não foi diferente entre os grupos, implicando que esses biomarcadores não estavam relacionados com o tamanho dos tumores primários ou a presença de metástase cervical. Entretanto, similar aos parâmetros histopatológicos observados anteriormente, p-53 estava associado com o menor grau de queratinização.

A região do cromossomo 11q13 está comumente amplificada nos cânceres humanos incluindo os de cabeça e pescoço, pulmão, esôfago, bexiga e mama (Schuuring et al., 1992; Bockmuhl et al., 1998). No câncer de mama, esta região

está amplificada em aproximadamente 13% dos tumores primários enquanto que em cânceres de cabeça e pescoço amplificação pode representar 40%-76% dos tumores. Este fragmento é grande com vários genes com conhecido potencial oncogênico (Bekri et al., 1997), entretanto, amplificação do 11q13 é descontínua (Karlseder et al., 1994). Uma análise mais detalhada desta região indicou que pelo menos cinco unidades distintas de amplificação existem no cromossomo 11q13 (Schaffer & Lodish, 1994; Bekri et al., 1997; Moncur et al, 1998).

Devido a prevalência de amplificação do cromossomo 11q13 em cânceres de cabeça e pescoço, dois genes foram selecionados, EMS1 e CPB-2 (Hsp47) esperando-se que mesmo com amplificação descontínua, um dos genes poderia estar relacionado com um dos grupos de tumores investigados. Entretanto, nos nossos tumores não foi observada associação significativa dessas proteínas com os grupos analisados.

Os pacientes que apresentaram menor sobrevida foram os que tiveram tumores que desenvolveram recorrência ou metástase (regional ou à distância). Microscopicamente, esses tumores apresentaram menor infiltração linfoplasmocitária e mais agressivo padrão de invasão. Outros autores também relataram que padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário são importantes para o prognóstico (Magnano et al., 1995; Hosai et al., 1998; Spiro et al., 1999).

Os resultados deste estudo indicaram que, mesmo quando grupos específicos de tumores que representam os extremos de um grande espectro clínico foram considerados, não foi possível identificar um consistente fator prognóstico. Considerando o fato que o grau de queratinização foi a única característica histopatológica diferente entre os grupos, estudos futuros em busca de biomarcadores deveriam considerar os genes associados com os mecanismos regulatórios da queratinização.

2- Hsp47 e Catepsina L: amplificação e expressão de proteínas em carcinoma espinocelular com múltiplos linfonodos regionais metastáticos

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar as características histopatológicas e os níveis de catepsina L (Cat L) e proteína de choque térmico 47 (Hsp47) em carcinoma espinocelular de cavidade oral com múltiplos linfonodos metastáticos e em tumores sem metástase linfonodal. As características histopatológicas analisadas foram grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, número de mitoses, padrão de invasão, estágio de invasão e infiltração linfo-plasmocitária. Expressão de proteínas e amplificação de DNA para Cat L e Hsp47 foram avaliadas através de imunohistoquímica e Real-Time PCR, respectivamente. Comparações entre os grupos foram feitas usando o teste Mann-Whitney. Grau de queratinização ($p=0,00$), pleomorfismo nuclear ($p=0,00$) e infiltração linfo-plasmocitária ($p=0,02$) foram diferentes entre os grupos. Outras características microscópicas não diferiram significativamente entre os grupos ($p> 0,05$). Embora os tumores primários com múltiplos linfonodos metastáticos revelaram maiores valores imunohistoquímicos e mais casos com amplificação para Cat L e

Hsp47, não foram diferentes entre os grupos ($p > 0,05$). Entretanto, Cat L e Hsp47 estavam fortemente associadas através da análise imunohistoquímica ($p=0,14$, $r=0,54$) e amplificação de DNA ($p=0,00$, $r=0,83$). Os resultados mostraram que grau de queratinização, infiltração linfo-plasmocitária e pleomorfismo nuclear são importantes características dos tumores primários com múltiplos linfonodos metastáticos.

Abstract

The aim of this study was to verify the histopathological features and the levels of Cathepsin L (Cat L) and heat shock protein 47 (Hsp47) in oral squamous cell carcinoma with multiple metastatic lymph nodes and in tumors without node metastases. Histopathological features such as degree of keratinization, nuclear pleomorphism, number of mitoses, pattern of invasion, stage of invasion and lympho-plasmocytic infiltration were analyzed. Protein expression and DNA amplification for Cat L and Hsp47 were evaluated by immunohistochemistry and Real-Time PCR, respectively. Group comparisons were made using a Mann-Whitney test. Degree of keratinization ($p=0.00$), nuclear pleomorphism ($p=0.00$) and lympho-plasmocytic infiltration ($p=0.02$) were different between groups. Other microscopic features did not differ significantly between groups ($p> 0.05$). Although primary tumors with multiple metastatic lymph nodes revealed higher immunohistochemical scores and more cases with DNA amplification for Cat L and Hsp47, no difference was found between groups ($p> 0.05$). However, Cat L and Hsp47 were strongly associated by immunohistochemical analysis ($p=0.14$, $r=0.54$) and DNA amplification ($p=0.00$, $r=0.83$). The results showed that degree

of keratinization, lympho-plasmocytic infiltration and nuclear pleomorphism are important characteristics of primary tumors with multiple lymph node metastases.

Introdução

Catepsina L (Cat L) é uma proteinase lisossômica presente na maioria das células, a qual participa do "turnover" de proteínas intracelulares e do processamento após a translação de alguns precursores de proteínas (Agarwal, 1990). Entretanto, em algumas circunstâncias, Cat L é secretada das células e torna-se ativada por outras proteinases como catepsina D, ativadores de plasminogênio e metaloproteinases de matriz, seguindo um modo de ativação em cascata. Devido a desregulação dos mecanismos de cascata nos tumores, a ativação dessas enzimas conduz a uma degradação descontrolada dos componentes da matriz extracelular incluindo laminina, fibronectina e colágeno tipo IV (Kos & Lah, 1998). Cat L também pode degradar diretamente as proteínas da matriz extracelular (Mason et al., 1986). Esta degradação dos componentes da matriz extracelular parece ser um importante fator para invasão e desenvolvimento de metástases (Kos & Lah, 1998).

Hsp47 é uma proteína de choque térmico (heat shock protein), a qual está associada com as cadeias de pró-colágeno no ponto inicial da translação de novas cadeias (Sauk et al., 1994). Hsp47 é descrita como chaperone por inibir a

proteólise das cadeias de pró-colágeno no trajeto do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi (Takechi et al., 1992; Jain et al., 1994). Embora as proteínas de choque térmico sejam residentes do retículo endoplasmático, sua manifestação na superfície das células tem sido observada (Ullrich et al., 1986; Vanbuskirk et al., 1989; Takemoto et al., 1992; Ferrarini et al., 1992; Freedman et al., 1992; Altmeyer et al., 1996; Sauk et al., 1998). Os mecanismos para a manifestação do Hsp47 na superfície celular são desconhecidos e considerados como anômalos. Entretanto, Sauk et al. (1998) demonstraram que células de camundongos 3T6 sujeitas as condições de estresse ou diminuição do pH perdem seu receptor de retenção para serem expressas na superfície da célula. Posteriormente, foi observado forte associação com a proteína CD9, proporcionando uma base para a interação das células tumorais com a matriz extracelular modulando invasão das células tumorais (Hebert et al., 1999).

Vários inibidores endógenos compondo a super família cistatina regulam a atividade de Cat L. Entretanto, é razoável considerar que além dos principais inibidores intracelulares (stefins A e B), outros componentes podem ser importantes no processo de inibição da Cat L. A hipótese que sugere que Hsp47 possa inibir Cat L é baseada no fato que a sequência de aminoácidos terminais NH₂ da Hsp47 demonstra identidade de 64% em relação ao gp46 (46-kDa

collagen-binding glycoprotein) que é uma proteína de choque térmico, e esta mostra uma significativa similaridade com membros da família de inibidores de protease (Clarke et al., 1991).

O objetivo deste estudo foi analisar os níveis de expressão de proteína e amplificação de DNA para Cat L e Hsp47 em tumores primários com múltiplos linfonodos metastáticos e em tumores sem metástase linfonodal e verificar associações destes marcadores.

Materiais e Métodos

Pacientes

Dez pacientes com tumores primários avançados sem envolvimento de linfonodos (T3T4N0) e 10 pacientes com mais de 4 linfonodos metastáticos foram selecionados para este estudo. Dados referentes a idade, sexo, raça, local do tumor, estágio T, estágio N, estágio M, tratamento, número de linfonodos positivos, recorrência, seguimento e situação na última consulta foram registrados (Tabelas 1 e 2).

Análise histopatológica

As lâminas dos espécimes cirúrgicos foram revistas sem informações clínicas. Os tumores foram classificados de acordo com o sistema proposto por Anneroth et al. (1987), o qual apresenta seis itens: a) queratinização, b) pleomorfismo nuclear, c) número de mitoses, d) padrão de invasão, e) estágio de invasão e f) infiltração linfo-plasmocitária. Cada tumor foi classificado seguindo um escala de 4 pontos de acordo com os itens descritos acima.

Análise imunohistoquímica

Foram realizados cortes de 5µm de espessura de tecidos incluídos em parafina e montados em slides de vidro. Os cortes foram desparafinados em 3 trocas de xilol (5, 5 e 2 minutos) seguidos de 2 trocas de 2 minutos cada em álcool etílico 100% e 95%. A reativação antigênica foi realizada colocando os cortes em um recipiente com solução citrato (Biogenex CA-USA, HK086-9K), e este recipiente foi colocado dentro de uma panela de pressão plástica, e todo esse conjunto foi colocado dentro do microondas.

Os cortes foram tratados em dois ciclos de 15 min cada, em potência máxima e potência 4, respectivamente. Atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3% e proteína não específica foi bloqueada com reagente bloqueador universal (Biogenex CA-USA, HK085-5K). Os cortes foram posteriormente lavados com solução fosfato tamponado (PBS: phosphate-buffered saline) e incubados por 1 hora com os seguinte anticorpos primários:

a) Hsp47 (StressGen, SPA-470) 1:1000

b) Cat L (Santa Cruz Biotechnology, sc-6500) 1:100

Após 2 lavagens com PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário por 30 min (Biogenex CA-USA, HK268-UK para Hsp47 e Biogenex CA-USA, HK327-UG para Cat L), sendo posteriormente lavados 2 vezes com PBS. Complexo Estreptoavidina/biotina (Dako, Denmark, K0377) foi aplicado por 30 min e após 2 lavagens de 2 min cada com PBS, os cortes foram corados com diaminobenzidina (DAB) e contra-corados com hematoxilina de Harris.

A positividade da reação imunohistoquímica foi classificada como : - (negativo; positividade entre 0 e 5%), + (fraco; entre 5% e 25%), ++ (moderado; entre 25% e 50%), e +++ (forte; mais que 50% das células tumorais).

Extração de DNA

Foi realizado um corte de 5µm de espessura no início, seguido por dez cortes seriados de 15µm e um corte final também de 5µm. Os cortes inicial e final de 5µm foram corados com hematoxilina e eosina com o objetivo de verificar a progressão do tecido no bloco. Os dez cortes de 15µm que foram utilizados para a extração do DNA, foram desparafinados com 3 lavagens de 3 min cada em xilol, sendo posteriormente lavados em trocas decrescentes em álcool etílico (2 trocas de 2 minutos cada em álcool etílico 100%, 95% e 70%, respectivamente).

Os espécimes foram incubados por 3 a 4 horas a -20°C e em seguida foi realizada dissecação dos cortes com agulha com o objetivo de obter amostras representativas de tumor e tecido normal, sendo coletadas em recipientes distintos. O material obtido foi suspenso novamente em um volume mínimo de tampão TE (PH 8,0) necessário para cobrir todo o tecido. Foi adicionado SDS para um volume final de 1% e agitado por 2 min. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora com agitação. Proteinase K foi adicionada para a concentração final de 0,5mg/ml e agitado por 2 minutos. Todo o volume foi incubado por 12 horas a $50-52^{\circ}\text{C}$ com agitação. No segundo dia, foi adicionado um volume de fenol igual ao volume de TE utilizado anteriormente para a suspensão do material dissecado. Após a adição de fenol e agitação por 2 minutos, a solução foi centrifugada por 15 min a 5000xg. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um outro tubo e adicionado um igual volume de clorofórmio e um volume igual de fenol. Após a agitação por 2 minutos, a solução foi centrifugada por 15 min a 5000xg. A fase aquosa foi novamente transferida para um outro tubo, volume igual de clorofórmio foi adicionado e agitado por 2 min e finalmente centrifugado por 15 min a 5000xg. Mais uma vez a fase aquosa foi transferida para outro tubo. NaCl a 5M foi adicionado em um volume correspondente a 0,02 vezes o volume inicial e álcool etílico 100% gelado foi adicionado correspondente a 2,5

vezes o volume inicial. A solução foi precipitada por 12 horas a -70°C . No terceiro dia a solução foi centrifugada por 30 min a $10,000-12,000\times g$ a uma temperatura de 4°C . Em seguida a solução aquosa foi desprezada e o DNA que ficou aderido a parede interna do tubo foi dissolvido com $30\mu\text{l}$ de tampão TE (PH 8,0). Os tubos foram movimentados por 3 horas e finalmente o DNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro.

Amplificação de DNA (Real-Time Quantitative PCR)

Para cada gene, dois oligonucleotídeos foram selecionados usando software Primer Express (PE Biosystems, Foster City, California). Os genes Hsp47 e Cat L foram amplificados usando os primers sense anti-sense como seguem:

Hsp47 (5'-TGCTGAGCCCGGAAACTC-3' e

5'- TTTCAGGGCAGGCAGAATG-3')

Cat L (5'-TCTTGAAGGACAGATGTTCCGG-3' e

5'-CATTGCAGCCTTCATTGCCT-3')

A reação de PCR foi conduzida usando SYBR[®] Green PCR kit (PE Applied Biosystems, Foster City, California). Para cada well foi incluído: $5\mu\text{l}$ de

solução de extração de DNA (25nM), 25µl de solução Master Mix (SYBR Green PCR Buffer, AmpErase® UNG, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dATP, dCTP, dGTP, dUTP e 25mM MgCl₂), 5µl de cada primer e 10µl de água. A amplificação foi realizada como segue: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C. Os ciclos térmicos e a detecção da fluorescência foram realizados usando o equipamento ABI 5700 Prism (PE Applied Biosystems, Foster City, California). Quantificação relativa de Hsp47 e Cat L foi realizada pela normalização dos resultados obtidos com β-Actina. A quantidade normalizada de cada um dos genes presentes no tumor foi determinada designando o tecido normal como calibrador usando o método Ct comparativo e o protocolo preconizado pela PE Biosystems. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Análise estatística

Comparações entre os grupos foram realizadas usando o teste Mann-Whitney e associações entre as variáveis foram avaliadas usando análises paramétricas e não-paramétricas. Significância estatística foi estabelecida em 5% ($p \leq 0,05$).

Tabela 1. Distribuição dos pacientes T3 T4 N0 de acordo com os dados clínicos.

caso	idade	sexo	raça	local	T	N	M	tratamento	recorrência/ metástase	seguimento meses	situação
1	67	M	N	assoalho	4	0	0	RC+ESOH+ECR+ RXT	não	99	vivo
2	75	F	B	assoalho	4	0	0	RC+ESOH+B+ RXT	local	30	falecido
3	61	M	B	retromolar	4	0	0	RC+ECR+RXT	não	63	vivo
4	66	M	B	língua	4	0	0	RC+ECR+RXT	pulmão	18	falecido
5	60	F	B	língua	3	0	0	RC+ESOH+B+ RXT	não	31	falecido*
6	35	M	N	língua	3	0	0	RC+ECR+RXT	pulmão	30	falecido
7	51	F	B	assoalho	4	0	0	RC+ESOH+ECR+ RXT	não	49	vivo
8	59	F	B	retromolar	4	0	0	RC+ECR+RXT	não	31	vivo
9	41	M	B	língua	3	0	0	RC+ECR+RXT	não	18	vivo
10	48	M	B	assoalho	4	0	0	RC+ESOH+ECR+ RXT	não	37	vivo

*morreu de causa não associada ao câncer

RC- ressecção cirúrgica, ESOH- esvaziamento supra-omo-hioideo, ESOHB- esvaziamento supra-omo-hioideo bilateral, ECR- esvaziamento cervical radical, ECRB- esvaziamento cervical radical bilateral, RXT- radioterapia

Tabela 2. Distribuição dos pacientes com múltiplos linfonodos metastáticos de acordo com os dados clínicos.

caso	idade	sexo	raça	local	T	N	M	tratamento	nº linfonodos metastáticos	recorrência/metástase	seguimento meses	situação
1	46	M	B	retromolar	4	2b	0	RC+ECR+RXT+CH	21	local + pescoço	13	falecido
2	66	M	B	retromolar	4	2b	0	RC+ECR+ RXT	21	pescoço	16	falecido
3	48	M	N	gengiva	4	2b	0	RC+ECR+ RXT	10	pulmão	8	falecido
4	45	M	N	assoalho	4	2b	0	RC+ECRB+ RXT+CH	8	local + pescoço	11	falecido
5	64	M	B	assoalho	3	2c	0	RC+ECRB+RXT	68	não	7	falecido
6	61	M	N	assoalho	2	2c	0	RC+ECRB+RXT	78	pescoço	8	falecido
7	59	M	N	língua	2	2b	0	RC+ECR+RXT	14	não	4	vivo
8	66	M	B	assoalho	2	2b	0	RC+ESOH+ECR+RXT+CH	5	não	5	vivo
9	68	M	B	assoalho	4	2c	0	RC+ECRB+RXT	11	não	10	vivo
10	77	F	B	língua	2	2b	0	RC+ECR+ RXT	4	pulmão	8	falecido

RC- ressecção cirúrgica, ESOH- esvaziamento supra-omo-hioideo, ESOHB- esvaziamento supra-omo-hioideo bilateral, ECR- esvaziamento cervical radical, ECRB- esvaziamento cervical radical bilateral, RXT- radioterapia, CH- quimioterapia

Resultados

Análise histopatológica

O grau de queratinização foi estatisticamente menor em tumores com múltiplos linfonodos metastáticos em relação aos tumores sem metástase regional ($p=0,00$). Pleomorfismo nuclear foi também diferente entre os grupos sendo mais evidente em tumores com múltiplos linfonodos ($p=0,00$). Infiltrado linfoplasmocitário foi menos intenso em tumores que desenvolveram metástases ($p=0,02$). Outras características microscópicas incluindo padrão de invasão, estágio de invasão e número de mitoses não foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p> 0,05$) (Tabela 3).

Análise imunohistoquímica

Imunopositividade para Hsp47 nos tumores primários sem metástase linfonodal (T3T4N0) foi vista em todos os 10 casos. Dois casos foram classificados como + (positividade entre 5 e 25% das células tumorais), 6 casos foram classificados com ++ (positividade entre 25 e 50% das células tumorais) e

2 casos como +++ (mais que 50% das células tumorais mostrando positividade). Cat L foi também positiva em todos os 10 casos, entretanto, 6 casos revelaram imunopositividade em mais que 50% das células tumorais. No grupo de tumores primários com múltiplos linfonodos metastáticos, mais casos tiveram alta classificação, sendo 6 casos como +++ para Hsp47 e 8 casos como +++ para Cat L. Embora mais casos com alta classificação para Hsp47 e Cat L foram observados em tumores primários com múltiplos linfonodos comparados com tumores sem metástase regional, não foi encontrada diferença entre os grupos (Tabela 4). Imunopositividade para Cat L e Hsp47 não foi associada com recorrência ou situação independentemente dos grupos. Entretanto, forte associação foi observada entre imunopositividade para Cat L e Hsp47 ($p=0,14$, $r=0,54$).

Amplificação de DNA (Real-Time PCR)

Amplificação de DNA para Hsp47 foi observada em 6 casos (60%) sem metástase linfonodal, variando de 1,41 a 2,65 vezes maior que DNA do tecido normal correspondendo (média 2,16 vezes). Os mesmos 6 casos apresentaram amplificação de DNA para Cat L variando de 1,22 a 4,05 vezes (média = 2,09

vezes). No grupo com múltiplos linfonodos metastáticos, amplificação de DNA para Hsp47 foi encontrada em 8 casos (80%) variando de 1,07 a 5,42 vezes (média = 2,38 vezes). Amplificação de DNA para Cat L foi vista nos mesmos 8 casos, variando de 1,04 a 2,50 vezes (média= 1,61 vezes). Forte associação entre amplificação para Cat L e Hsp47 foi encontrada ($p=0,00$, $r=0,83$). Amplificação de DNA para Cat L e Hsp47 foi vista em 8 dos 9 casos (88,8%) com recorrências e em 6 dos 11 casos (54,5%) sem recorrências. Com relação a situação na última consulta, 8 dos 10 pacientes (80%) que morreram devido ao câncer mostraram amplificação de DNA para Cat L e Hsp47 comparados aos 6 dos 10 pacientes (60%) que estavam vivos. Entretanto, não foi encontrada associação estatística (Tabela 5).

Tabela 3. Distribuição dos grupos de acordo com as características histopatológicas.

Grupos	Múltiplos				T3T4N0				
	linfonodos								
Classificação	1	2	3	4	1	2	3	4	p*
Queratinização	1	2	3	4	10	0	0	0	0,00
Pleomorfismo nuclear	1	1	4	4	4	5	1	0	0,00
Número de mitoses	7	2	1	0	4	5	1	0	0,35
Padrão de invasão	0	1	5	4	0	0	10	0	0,28
Estágio de invasão	0	0	10	0	0	0	10	0	1,00
Infiltração linfo-plasmocitária	0	4	6	0	5	3	2	0	0,02

p* teste estatístico Mann-Whitney

Tabela 4. Distribuição dos grupos de acordo com a imunopositividade.

Casos	Múltiplos				T3T4N0				P*
	linfonodos								
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	
Hsp-47	1	0	3	6	0	2	6	2	0,35
Cat L	1	0	1	8	0	1	3	6	0,52

p* teste estatístico Mann-Whitney

Tabela 5. Distribuição dos grupos de acordo com a imunopositividade e amplificação Real-Time PCR.

	Múltiplos linfonodos				T3T4N0			
	Hsp-47		Cat L		Hsp-47		Cat L	
	*	#	*	#	*	#	*	#
1	++	1,13	+++	1,41	++	0	+++	0
2	+++	1,27	+++	1,5	++	0	+++	0
3	+++	1,76	+++	1,05	+	0	+	0
4	+++	5,42	++	2,5	+++	2,32	+++	1,22
5	+++	0	+++	0	++	2,65	++	1,38
6	+++	1,5	+++	1,1	++	2,09	++	2,58
7	++	1,6	+++	2,42	++	2,56	+++	4,05
8	++	0	+++	0	+++	0	+++	0
9	-	5,35	-	1,86	++	1,94	+++	1,98
10	+++	1,07	+++	1,04	+	1,41	++	1,33

* imunohistoquímica: - negativo, + fraco, ++ moderado, +++ forte; # PCR: amplificação em relação ao tecido normal correspondente.

Discussão

O desenvolvimento de metástase linfonodal tem sido apontado como o mais importante fator para prever o prognóstico e sobrevida (Farr et al., 1980). O envolvimento de um único linfonodo ipsilateral é considerado reduzir a sobrevida em 50% (Batsakis, 1979). Quando múltiplos linfonodos são afetados, o prognóstico é ainda pior, com maior probabilidade de desenvolvimento de metástase à distância e baixa taxa de sobrevida (Vikram et al., 1984; Shingaki et al., 1996; Noguchi et al., 1999; Smeele et al., 2000; Kowalski et al., 2000). Ono et al. (1985) reportaram sobrevida de 75% em 5 anos em casos sem linfonodos positivos e 26% em casos com múltiplos linfonodos metastáticos. Devido a grande influência no prognóstico, vários estudos têm analisado os tumores primários com o objetivo de identificar fatores que poderiam estar associadas com metástase regional.

Características histopatológicas dos tumores primários juntamente com os dados clínicos são primariamente avaliados e têm sido descritos como importantes para o prognóstico (Woolgar & Scott, 1995; Noguchi et al., 1999). Em nosso estudo, nós observamos que tumores com múltiplos linfonodos metastáticos apresentaram baixo grau de queratinização em contraste com

tumores sem metástase regional, os quais foram muito queratinizados. Take et al. (1999) descreveram que queratinização é a mais importante característica histopatológica associada com metástase linfonodal. Pleomorfismo nuclear e intensidade de infiltração linfo-plasmocitária também foram diferentes entre nossos grupos, onde tumores com múltiplos linfonodos metastáticos apresentaram mais células pleomórficas e menos infiltração linfo-plasmocitária. Embora outros estudos tenham mostrado que estágio de invasão, padrão de invasão e número de mitoses foram relacionados com metástase, em nossos casos não foi observada diferença entre os grupos.

Vários outros marcadores biológicos incluindo proteinases e seus inibidores endógenos têm sido estudados. Kirschke et al. (2000) observaram que redução do nível de RNAm, diminuição da atividade intracelular de Cat L e redução da quantidade pro-catepsina L secretada em duas linhagens de células malignas (células de mieloma SP e L) usando inibição anti-sense de RNA. Quando foi testado em camundongos, as células com baixa atividade de catepsina exibiram significativa diminuição do potencial de crescimento comparado com as células controle com o nível normal de atividade de catepsina L.

Em câncer de mama, tumores primários com alta concentração de Cat L têm maior risco de recorrência e baixa taxa de sobrevida (Thomssen et al., 1995;

Foekens et al., 1998; Thomssen et al., 1998; Harbeck et al., 2000; Lah et al., 2000a). Além de Cat L, outros fatores proteolíticos estão associados com o prognóstico de câncer de mama como Cat D, Cat B, uPA (urokinase-type plasminogen activator), PAI-1 (uPA inhibitor type 1) (Thomssen et al., 1998; Harbeck et al., 2000; Lah et al., 2000a; Lah et al., 2000b). Cat L também tem sido reportada ser associada com o grau de malignidade (Lah et al., 2000a; Lah et al., 2000b) e número de linfonodos positivos (Foekens et al., 1998). Em câncer de pulmão, atividade de Cat L e concentração de proteína foram maiores em tumores pobremente diferenciados, entretanto, não foi possível estabelecer o valor prognóstico devido ao limitado número de pacientes (Ledakis et al., 1996). Em outro estudo em câncer de pulmão, aumento da expressão da protease estromelisina 3 foi relacionada com o envolvimento de linfonodos, entretanto, não foi observada associação com Cat L (Delebecq et al., 2000). Cat L também tem sido analisada em tumores malignos de cérebro, próstata, tireóide, estômago, bem como em fluidos corpóreos de pacientes com melanoma, câncer de ovário, útero e coloretal (Plebani et al., 1995; Kos et al., 1997; Kos & Lah, 1998; Friedrich et al., 1999; Plehn et al., 2000).

Na região de cabeça e pescoço, além de poucos estudos terem avaliado a atividade de catepsina sérica como potencial marcador de prognóstico, os

resultados não são claros (Krecicki & Siewinski, 1992; Bongers et al., 1995). Análises da concentração de catepsina em tumores primários de cabeça e pescoço, foi observado que Cat L, assim como Cat B, H e D foram maiores em tumores de laringe em relação aos tumores de outras localizações. Além disso, taxas de sobrevida foram melhores em pacientes com baixa concentração de Cat L e alta concentração de stefin A e stefin B (Budihna et al., 1996). Outros relatos também têm observado associação do prognóstico com concentração de inibidores de catepsinas em tumores de cabeça e pescoço (Kos et al., 1995; Smid et al., 1997). Strojjan et al. (2000) mostraram maior concentração de Cat L em tumores de cabeça e pescoço em relação ao tecido normal correspondente, e associação da concentração de Cat L com tamanho do tumor e envolvimento de metástase linfonodal. Entretanto, sem significância para o prognóstico.

Muitos fatores estão relacionados com a atividade de Cat L, no entanto, inibidores endógenos parecem ser os mais importantes. Hsp47 pode participar na inibição da Cat L, visto que é similar ao gp46 o qual é similar a inibidor de proteases.

Morino et al. (1997) observaram maiores níveis da expressão de Hsp47 em linhagens de células de tumores humanos derivadas de carcinomas metastáticos e sugeriram que Hsp47 pode ser um marcador de prognóstico. Em contraste, outros

trabalhos mostraram que a expressão de Hsp47 diminui quando o tumor torna-se mais agressivo (Shirakami et al., 1995).

Em nosso estudo, mais casos com maior imunopositividade e amplificação de DNA para Hsp47 e Cat L foram vistos em tumores primários com múltiplos linfonodos metastáticos. Amplificação de DNA também foi mais freqüente em pacientes que desenvolveram recorrência ou morreram devido ao câncer, embora não foi observada associação estatística. Além disso, direta relação entre Hsp47 e Cat L foi verificada. Todos os casos com amplificação de DNA para Hsp47 também apresentaram amplificação para Cat L independentemente do grupo de tumores.

Em conclusão, nossos resultados mostraram que tumores primários com múltiplos linfonodos metastáticos são pobremente diferenciados apresentando baixo grau de queratinização, pouca infiltração linfo-plasmocitária e intenso pleomorfismo nuclear. Embora tenha sido observada uma tendência da associação de Hsp47 e Cat L com metástase linfonodal, recorrência e situação clínica, não havia significância estatística, fato que poderá ser melhor entendido em estudos futuros com maiores séries de carcinoma espinocelulares de cabeça e pescoço.

3- Amplificação e expressão de proteínas dos genes da região q13-15 do cromossomo 12 em osteossarcomas dos maxilares

Resumo

Aumento da expressão e amplificação de vários genes (MDM2, CDK4 e SAS) localizados no cromossomo 12q13-15 têm sido notado em sarcomas humanos. Como resultado, dois importantes mecanismos de regulação de crescimento podem ser inibidos. MDM2 pode desregular o controle de crescimento mediado pelo p53 e CDK4 pode afetar os eventos mediados pelo Rb. Para determinar a frequência de alterações nestes genes e a correlação com características clínico-patológicas, os níveis da proteína MDM2 e CDK4 foram avaliados através de imunohistoquímica e amplificação de MDM2, CDK4 e SAS através de Real-Time PCR em 9 osteossarcomas dos maxilares. Imunopositividade para CDK4 e MDM2 foi observada em 8 (88,8%) e 5 casos (55,5%), respectivamente. Forte positividade para CDK4 foi observado em 4 casos (2 de alto grau, 1 de grau intermediário e 1 de baixo grau). Forte positividade para MDM2 foi verificada nos mesmos 4 casos, assim como em um caso adicional de tumor de alto grau. Amplificação isolada para CDK4, MDM2 e

SAS foi observada em 6 casos para cada gene. Co-amplificação foi verificada em 5 casos que mostraram amplificação simultânea para CDK4 e MDM2 e 4 casos que apresentaram amplificação concomitante para os três genes. Além disso, entre os 5 casos que apresentaram amplificação para CDK4 e MDM2, também foi observada forte imunopositividade para CDK4 e MDM2 em 3 e em 4 casos, respectivamente (3 de alto grau e 1 de grau intermediário). Os resultados sugerem que esses marcadores estão envolvidos no desenvolvimento neoplásico e a imunopositividade e amplificação podem auxiliar a identificação de tumores de alto grau de malignidade.

Abstract

Overexpression and amplification of several genes (MDM2, CDK4 and SAS) located on chromosome 12q13-15 have been noted to occur in various human sarcomas. As a result, two major growth regulation pathways may be inhibited. MDM2 may down regulate the p53-mediated growth control and CDK4 may affect pRb-mediated events. To determine the frequency of alterations in these genes and their correlation with clinicopathologic features, we analyzed the MDM2 and CDK4 protein levels by immunohistochemistry and assessed MDM2, CDK4 and SAS amplification by Real-Time PCR in 9 osteosarcomas of the jaws. Positive staining for CDK4 and MDM2 was observed in 8 cases (88.8%) and 5 cases (55.5%), respectively. Intense CDK4 staining was noted in 4 cases (2 high grade, 1 intermediate grade and 1 low grade). Intense MDM2 staining was observed in the same 4 previous cases, as well as, one additional high-grade tumor. Individual DNA amplification for CDK4, MDM2 and SAS was observed in 6 cases for each gene. Co-amplification was observed in 5 cases that showed CDK4 and MDM2 concomitant amplification and 4 cases that displayed amplification for all of the genes. In addition, among the 5 cases that presented CDK4 and MDM2 amplification, strong overexpression of CDK4

and MDM2 was observed in 3 and in 4 cases, respectively (3 high grade and 1 intermediate grade). These results suggest that 12q13-15 genes are involved in neoplastic disease and concurrent amplification and overexpression of these genes might help to define high-grade tumors.

Introdução

Osteossarcoma (OS) é um tumor ósseo maligno raro e agressivo que ocorre mais comumente em ossos longos de crianças e adultos jovens (Antman et al., 1989; Huvos, 1991). A incidência destes tumores na região de cabeça e pescoço é extremamente rara representando aproximadamente 10% de todos os OSs e afeta predominantemente a mandíbula e maxila (Vege et al., 1991; Wanebo et al., 1992). O pico de incidência na região de cabeça e pescoço é entre a 3ª e 4ª décadas, uma década a mais que em ossos longos (Mark et al., 1991; Delgado et al., 1994).

Embora avanços no tratamento têm sido obtidos em OSs de ossos longos, devido a baixa ocorrência, o comportamento destes tumores continua pobremente entendido na região de cabeça e pescoço (Smeele et al., 1997).

Análises de alterações genéticas têm contribuído para um melhor entendimento dos mecanismos de oncogênese e do comportamento biológico dos tumores. Amplificação e expressão da região q13-15 do cromossomo 12 têm sido associadas com uma variedade de tumores, incluindo osteossarcomas. Embora esta região contenha inúmeros genes, parece que alguns alvos específicos estão

envolvidos na amplificação desta região (Wunder et al. 1999). Entre os genes, MDM2 (murine double minute 2), CDK4 (cyclin dependent kinase 4) e SAS (sarcoma amplified sequence) têm sido identificados como os principais pontos de amplificação (Leach et al., 1993).

O gene MDM2 codifica uma proteína que liga e inativa a proteína do gene supressor de tumor p53. Interessante que alterações no MDM2 e p53 usualmente não ocorrem simultaneamente sugerindo que amplificação do MDM2 pode ser uma alternativa para a mutação no p53 durante a gênese dos tumores e progressão dos sarcomas (Oliner et al., 1992; Momand et al., 1992; Leach et al., 1993; Barak et al., 1993; Meltzer, 1994).

Da mesma maneira, o gene CDK4 codifica uma proteína que atua durante a fase G1 do ciclo celular fosforilando e inativando a proteína do gene supressor de tumor retinoblastoma (pRb) conduzindo a célula a entrar na fase S e possibilitando a progressão do ciclo celular (Kato et al., 1993; Khatib et al., 1993; Ewen et al., 1993; Matsushime et al., 1994). O gene SAS por sua vez codifica uma proteína trans-membrânica (transmembrane four-superfamily protein; TM4SF) cujos membros podem ter participação na tradução de sinais e controle do crescimento celular (Meltzer et al., 1991; Jankowski et al., 1994; Jankowski et al., 1995).

Apesar de terem sido relatados na amplificação da região 12q13-15, esses três genes estão localizados em duas regiões descontínuas, uma contendo MDM2 e outra contendo CDK4/SAS (Nilbert et al., 1995; Berner et al., 1996; Reifemberger et al., 1996), que estão unidos e freqüentemente co-amplificados (Elkahloun et al., 1996).

Embora esses três marcadores têm sido reportados em OSs de ossos longos, há pouca informação desses genes e seus produtos em OSs de cabeça e pescoço. No presente estudo nós descreveremos as características clínicas e histopatológicas de osteossarcomas de cabeça e pescoço e avaliaremos a produção de proteínas e amplificação de CDK4, MDM2 e SAS utilizando imunohistoquímica e PCR em tempo real (Real-Time PCR).

Materiais e Métodos

Pacientes

No período entre fevereiro de 1991 e julho de 1999 foram atendidos no Departamento de Cirurgia Oral e Maxilofacial, Universidade de Maryland, 9 pacientes com osteossarcomas dos maxilares. Informações clínicas foram coletadas dos prontuários médicos.

Análise histopatológica

Os casos de osteossarcoma foram classificados quanto ao grau de malignidade (baixo, médio e alto) e tipo celular (condroblástico, osteoblástico e fibroblástico).

Análise imunohistoquímica

Foram realizados cortes de 5µm de espessura de tecidos incluídos em parafina e montados em slides de vidro. Os cortes foram desparafinados em 3

trocas de xilol (5, 5 e 2 minutos) seguidos de 2 trocas de 2 minutos cada em álcool etílico 100% e 95%. A reativação antigênica foi realizada colocando os cortes em um recipiente com solução citrato (Biogenex CA-USA, HK086-9K), e este recipiente foi colocado dentro de uma panela de pressão plástica, e todo esse conjunto foi colocado dentro do microondas.

Os cortes foram tratados em dois ciclos de 15 min cada, em potência máxima e potência 4, respectivamente. Atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3% e proteína não específica foi bloqueada com reagente bloqueador universal (Biogenex CA-USA, HK085-5K). Os cortes foram posteriormente lavados com solução fosfato tamponado (PBS: phosphate-buffered saline) e incubados por 1 hora com os seguinte anticorpos primários:

- a) p-53 (Biogenex CA-USA, MU195-UC) 1:50
- b) MDM2 (Santa Cruz Biotechnology SMP14, sc-965) 1:50
- c) CDK4 (Santa Cruz Biotechnology, C-22 sc-260-G) 1:50
- d) Rb (Pharmingen, San Diego, CA-USA, G99-549) 1:10

Após 2 lavagens com PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário por 30 min (Biogenex CA-USA, HK268-UK para MDM2, p53 e Rb e

Biogenex CA-USA, HK327-UG para CDK4), sendo posteriormente lavados 2 vezes com PBS. Complexo Estreptoavidina/biotina (Dako, Denmark, K0377) foi aplicado por 30 min e após 2 lavagens de 2 min cada com PBS, os cortes foram corados com diaminobenzidina (DAB) e contra-corados com hematoxilina de Harris.

A positividade da reação imunohistoquímica foi classificada como : - (negativo; positividade entre 0 e 5%), + (fraco; entre 5% e 25%), ++ (moderado; entre 25% e 50%), e +++ (forte; mais que 50% das células tumorais).

Extração de DNA

Foi realizado um corte de 5µm de espessura no início, seguido por dez cortes seriados de 15µm e um corte final também de 5µm. Os cortes inicial e final de 5µm foram corados com hematoxilina e eosina com o objetivo de verificar a progressão do tecido no bloco. Os dez cortes de 15µm que foram utilizados para a extração do DNA, foram desparafinados com 3 lavagens de 3 min cada em xilol, sendo posteriormente lavados em trocas decrescentes em álcool etílico (2 trocas de 2 minutos cada em álcool etílico 100%, 95% e 70%, respectivamente). Os espécimes foram incubados por 3 a 4 horas a -20°C e em seguida foi realizada

dissecção dos cortes com agulha com o objetivo de obter amostras representativas de tumor e tecido normal, sendo coletadas em recipientes distintos. O material obtido foi suspenso novamente em um volume mínimo de tampão TE (PH 8,0) necessário para cobrir todo o tecido. Foi adicionado SDS para um volume final de 1% e agitado por 2 min. As amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora com agitação. Proteinase K foi adicionada para a concentração final de 0,5mg/ml e agitado por 2 minutos. Todo o volume foi incubado por 12 horas a 50-52°C com agitação. No segundo dia, foi adicionado um volume de fenol igual ao volume de TE utilizado anteriormente para a suspensão do material dissecado. Após a adição de fenol e agitação por 2 minutos, a solução foi centrifugada por 15 min a 5000xg. Em seguida, a fase aquosa foi transferida para um outro tubo e adicionado um igual volume de clorofórmio e um volume igual de fenol. Após a agitação por 2 minutos, a solução foi centrifugada por 15 min a 5000xg. A fase aquosa foi novamente transferida para um outro tubo, volume igual de clorofórmio foi adicionado e agitado por 2 min e finalmente centrifugado por 15 min a 5000xg. Mais uma vez a fase aquosa foi transferida para outro tubo. NaCl a 5M foi adicionado em um volume correspondente a 0,02 vezes o volume inicial e álcool etílico 100% gelado foi adicionado correspondente a 2,5 vezes o volume inicial. A solução foi precipitada por 12 horas a -70°C. No

terceiro dia a solução foi centrifugada por 30 min a 10,000-12,000xg a uma temperatura de 4°C. Em seguida a solução aquosa foi desprezada e o DNA que ficou aderido a parede interna do tubo foi dissolvido com 30µl de tampão TE (PH 8,0). Os tubos foram movimentados por 3 horas e finalmente o DNA foi quantificado utilizando espectrofotômetro.

Amplificação de DNA (Real-Time Quantitative PCR)

Para cada gene, dois oligonucleotídeos foram selecionados usando software Primer Express (PE Biosystems, Foster City, California). Os genes CDK4, MDM2 e SAS foram amplificados usando os primers sense e anti-sense como seguem:

CDK4 (5'-AGATTGCCCTCTCAGTGTCCA-3' e

5'-TGGAAGGAAGAAAAGCTGCC-3'),

MDM2 (5'-TCCCCGTGAAGGAAACTGG-3' e

5'-TTTCGCGCTTGGAGTCG-3') e

SAS (5'-TGGAAGACGGTCCCCAATAC-3' e

5'-ACCCAAGTGGTCCCCAAGGA-3').

A reação de PCR foi conduzida usando SYBR[®] Green PCR kit (PE Applied Biosystems, Foster City, California). Para cada well foi incluído: 5µl de solução de extração de DNA (25nM), 25µl de solução Master Mix (SYBR Green PCR Buffer, AmpErase[®] UNG, AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase, dATP, dCTP, dGTP, dUTP e 25mM MgCl₂), 5µl de cada primer e 10µl de água. A amplificação foi realizada como segue: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 seg. a 95°C e 1 min a 60°C. Os ciclos térmicos e a detecção da fluorescência foram realizados usando o equipamento ABI 5700 Prism (PE Applied Biosystems, Foster City, California). Quantificação relativa de CDK4, MDM2 e SAS foi realizada pela normalização dos resultados obtidos com β -Actina. A quantidade normalizada de cada um dos genes presentes no tumor foi determinada designando o tecido normal como calibrador usando o método Ct comparativo e o protocolo preconizado pela PE Biosystems. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Resultados

Todos os nove pacientes estudados eram brancos e a maioria era do sexo feminino (6/9, 66,6%). A idade dos pacientes no momento do diagnóstico variou de 20 a 64 anos (média, 44,66 anos). Com relação a localização, 5 eram na maxila (2 anterior e 3 posterior) e 4 mandíbula (1 anterior e 3 posterior). A média do tamanho dos tumores foi 2,83cm (variando de 1,0 a 5,0cm) (Tabela 1).

Um paciente (caso 3) foi julgado ser de alto risco para desenvolvimento de OS por ter sido previamente diagnosticada com carcinoma papilífero da tireóide aos nove anos de idade, o qual foi removido cirurgicamente seguido de radioterapia convencional (60Cy) e três cursos de iodo radioativo. Após onze anos a paciente desenvolveu osteossarcoma de mandíbula.

A análise histopatológica das lesões revelou que o tipo condroblástico foi o mais comum correspondendo a 6 casos (66,6%). Entretanto, dois casos foram classificados como osteoblástico e o outro como parosteal. A distribuição de acordo com o grau de malignidade indicou que 4 casos foram de baixo grau, 2 casos foram de grau intermediário e outros 3 foram de alto grau (Tabela 2).

Análise imunohistoquímica revelou que CDK4 foi positivo em 8 casos (88,8%). Entretanto, forte positividade foi observada em 4 casos, 1 baixo grau, 1

grau intermediário e 2 de alto grau de malignidade. Por outro lado, Rb foi positivo somente em um caso (11,2%) correspondendo ao caso que foi negativo para CDK4. Positividade para MDM2 foi observada em 5 casos (55,5%) e em todos foi forte, correspondendo aos mesmos 4 casos que mostraram forte positividade para CDK4 e um caso adicional de alto grau. Positividade para p53 ocorreu em 8 casos (88,8%) e em 5 deles foi positivo para MDM2 (Tabela 2).

Amplificação de DNA avaliada através de Real-Time PCR para CDK4 foi observada em 6 casos (66,6%). Quatro casos apresentaram amplificação variando de 2,58 a 11,31 vezes maior que o DNA do tecido normal correspondente e em outros 2 casos a amplificação foi muito alta, correspondendo a mais de 200 vezes o tecido normal. Amplificação para MDM2 foi também observada em 6 casos. Em 4 casos, amplificação variou de 1,5 a 11,15 vezes o tecido normal e em outros 2 casos, correspondendo aos mesmos 2 casos prévios com alta amplificação para CDK4, foi 33,82 e 110,66 vezes o normal, respectivamente. Amplificação para SAS foi também observada em 6 casos (66.6%). Em três casos amplificação variou de 1,33 a 3,22 vezes o normal. Em um caso (caso 2), classificado como OS parosteal, SAS foi amplificado 31,12 vezes mais que o tecido normal, entretanto, neste caso não teve amplificação para CDK4 e MDM2. Além disso, os outros 2 casos, correspondendo aos mesmos casos com

alta amplificação para CDK4 e MDM2, também apresentaram altos nível de amplificação para o SAS (casos 4 e 8) (Tabela 2).

Analisando a associação da amplificação de DNA e expressão de proteínas através de imunohistoquímica, foi observado que três tumores de baixo grau (casos 1, 7 e 8) manifestaram amplificação mas tiveram ausência ou baixo nível de expressão de proteína. Expressão de MDM2 foi negativa em todos os três e CDK4 foi fraco em 2 casos e moderado em outro. Em contraste, outros quatro tumores (casos 3, 4, 6 e 9), além da amplificação de DNA também revelaram forte positividade para MDM2 e CDK4 em quatro e em três casos, respectivamente. Histologicamente, 3 desses 4 casos foram classificados com de alto grau e outro como de grau intermediário.

Todos os nove casos foram tratados cirurgicamente com ressecção radical. Em um paciente (caso 5), que apresentou tumor na região posterior de mandíbula, esvaziamento cervical supra-omo-hioideo foi também realizado. Quimioterapia adjuvante foi empregada no caso 3, por ser um tumor de alto grau. Com o objetivo de melhorar o controle local, o paciente 6 recebeu radioterapia pós-operatória devido a pequenas margens cirúrgicas e por ser o tumor de alto grau. No caso 9, embora o tumor fosse de alto grau, quimioterapia adjuvante não foi usada devido as precárias condições médicas que incluía falha renal secundária a

severa diabetes insulina dependente e doença da artéria coronária. O seguimento variou de 5 a 60 meses (média, 19,67 meses) e até a última avaliação todos os pacientes estavam vivos sem evidência de recorrência ou metástase (Tabela 3).

Tabela 1. Distribuição dos pacientes de acordo com as características clínicas.

Caso	Idade (anos)	Sexo	Raça	Localização	Tamanho (cm)
1	32	F	B	Maxila; anterior	1.0 x 1.0
2	36	F	B	Maxila; posterior	5.0 x 4.0
3	20	F	B	Mandíbula; posterior	2.5 x 1.7
4	63	M	B	Maxila; anterior	1.5 x 1.0
5	40	F	B	Mandíbula; posterior	3.0 x 1.5
6	46	M	B	Maxila; posterior	4.0 x 2.0
7	50	F	B	Mandíbula; anterior	1.6 x 1.5
8	51	M	B	Maxila; posterior	2.4 x 2.0
9	64	F	B	Mandíbula; posterior	4.5 x 3.0

Tabela 2. Tipo histológico, grau de malignidade, imunohistoquímica e PCR.

Caso	Tipo histológico	Grau	CDK4*	Rb*	MDM2*	p53*	CDK4 [#]	MDM2 [#]	SAS [#]
1	Condroblástico	Baixo	+	-	-	++	5.97	0	0
2	Parosteal	Baixo	+++	-	+++	+++	0	0	31.12
3	Condroblástico	Alto	+++	-	+++	+++	2.65	4.19	1.33
4	Condroblástico	Intermediário	+++	-	+++	+++	247.27	33.82	170.07
5	Condroblástico	Intermediário	++	-	-	++	0	0	0
6	Osteoblástico	Alto	-	++	+++	+++	11.31	11.15	3.22
7	Condroblástico	Baixo	+	-	-	-	0	1.75	1.41
8	Condroblástico	Baixo	++	-	-	+	203.65	110.66	152.21
9	Osteoblástico	Alto	+++	-	+++	+++	2.58	1.50	0

* imunohistoquímica: - negativo, + fraco, ++ moderado, +++ forte; # Real-Time PCR: amplificação em relação ao tecido normal correspondente

Tabela 3. Distribuição dos pacientes de acordo com as modalidades de tratamento, seguimento e situação na ultima avaliação.

Caso	Tratamento	Margens cirúrgicas	Recorrência/ Metástase	Seguimento (meses)	Situação
1	Cirurgia	Negativas	Não	11	Vivo
2	Cirurgia	Negativas	Não	12	Vivo
3	Cirurgia + Quimioterapia	Negativas	Não	33	Vivo
4	Cirurgia	Negativas	Não	19	Vivo
5	Cirurgia + ESOH	Negativas	Não	60	Vivo
6	Cirurgia + radioterapia	Próximas	Não	21	Vivo
7	Cirurgia	Negativas	Não	10	Vivo
8	Cirurgia	Próximas	Não	6	Vivo
9	Cirurgia	Negativas	Não	5	Vivo

ESOH-esvaziamento supra-omo-hioideo

Discussão

Osteossarcoma de cabeça e pescoço é muito incomum. A média de idade dos pacientes é entre 26 a 40 anos sem predileção por sexo ou raça (Vege et al., 1991; Ha et al., 1999). Em nossa série de 9 OS dos maxilares, observamos que 5 ocorreram na maxila e 4 na mandíbula. A idade média foi discretamente maior que em outros estudos (44,66 anos), dado que pode ser explicado pela presença de 2 pacientes com idade acima dos 60 anos.

Vários fatores de risco têm sido associados com o desenvolvimento do OS em geral, incluindo retinoblastoma, síndrome de Li-Fraumeni, doença de Paget e história de tratamento radioterápico (Goorin et al., 1985; Malkin et al., 1990). Em 18 osteossarcomas de cabeça e pescoço, Mark et al. (1991) reportaram que 4 pacientes tinham história de radioterapia prévia na área do tumor e em 3 foram para tratamento de retinoblastoma. Em outra série de 27 casos, 7 pacientes receberam radioterapia, sendo 2 deles para retinoblastoma (Ha et al., 1999). Entre nossos casos, somente 1 paciente recebeu radioterapia para tratamento de carcinoma papilífero de tireóide onze anos antes do diagnóstico de osteossarcoma de mandíbula.

Osteossarcoma condroblástico tem sido reportado como o tipo histológico mais comum (Clark et al., 1983; Vege et al., 1991; Delgado et al., 1994). Entretanto, outros têm indicado que osteossarcoma osteoblástico é o mais freqüente em cabeça e pescoço (Garrington et al., 1967; Caron et al., 1971; Bertoni et al., 1991; Oda et al., 1997; Lewis et al., 1997; Ha et al., 1999). Na presente série, osteossarcoma condroblástico foi o tipo histológico predominante correspondendo a 6 casos, seguido por 2 osteossarcomas osteoblásticos e 1 parosteal. Considerando o grau de malignidade, há uma disparidade na literatura com algumas séries mostrando uma preponderância de tumores de baixo grau na região de cabeça e pescoço (deFries et al., 1979), enquanto outros estudos relataram alta proporção de osteossarcomas de alto grau de malignidade (Oda et al., 1997). Na presente série, 4 casos foram classificados como baixo grau, 3 como de alto grau e outros 2 como grau intermediário.

O tratamento de escolha para o OS de cabeça e pescoço tem sido geralmente ressecção cirúrgica com amplas margens (Mark et al., 1991; Bertoni et al., 1991). O uso de tratamento adjuvante como quimioterapia e radioterapia tem sido discutido (Smeele et al., 1997; Kassir et al., 1997). Todos os nossos casos foram tratados cirurgicamente. No entanto, quimioterapia e radioterapia

pós-operatórias foram recomendadas respectivamente em um tumor de alto grau de malignidade e em outro caso que apresentou margens cirúrgicas próximas.

Alterações no cromossomo 12q13-15 têm sido descritas em OSs, principalmente envolvendo os genes MDM2, CDK4 e SAS (Leach et al., 1993; Khatib et al., 1993; Miller et al., 1996; Kanoe et al., 1998). Além disso, análises desta região têm mostrado que amplificações do MDM2 e CDK4/SAS são eventos independentes (Berner et al., 1996). A teoria prevalecente relata que MDM2 e CDK4 são mecanismos alternativos para inativação do p53 e Rb, respectivamente. Entretanto, alguns estudos têm mostrado existência concomitante da amplificação de MDM2 e aumento da expressão de p53 (Lonardo et al., 1997). A presente série suporta este conceito no qual foram observados amplificação de MDM2 e aumento da expressão de p53. Embora amplificação do gene CDK4 juntamente com mutação no Rb também tenham sido descritas (Kanoe et al., 1998), na presente série casos imunopositivos para CDK4 foram imunonegativos para Rb, e somente um caso que mostrou positividade para Rb foi CDK4 negativo. Entretanto, o anticorpo usado neste estudo contra a proteína Rb detecta somente a forma funcional hipofosforilada do Rb. Sendo assim, ausência de positividade do Rb em casos CDK4 positivos suporta a teoria prevalecente que sugere que a proteína CDK4 fosforila e inativa o Rb funcional.

A relação do CDK4, SAS e MDM2 com o grau histológico de malignidade foi evidente quando a amplificação e expressão de proteínas foram analisadas simultaneamente. Sendo assim, co-amplificação e forte expressão de proteínas do CDK4, SAS e MDM2 foram observadas em 4 casos (3 de alto grau e 1 de grau intermediário). Por outro lado, o único Os parosteal, também mostrou forte expressão de CDK4 e MDM2 mas não amplificação destes genes, a qual foi observada somente para SAS. Estes achados variam dos relatados por Ragazzini et al. (1999) que encontraram expressão de MDM2 e CKD4 respectivamente em 7/20 (35%) e 13/20 (65%) casos de osteossarcomas de baixo grau de malignidade.

Levando-se em consideração que amplificação e aumento da expressão dos genes são mecanismos pelos quais as células tumorais podem aumentar a expressão de proteínas e ter vantagens de proliferação, é razoável considerar que estas alterações são comumente associadas com a progressão dos tumores. Conseqüentemente, a associação destes genes com recorrência ou metástase de OS tem sido notada por vários investigadores (Ladanyi et al., 1993; Lonardo et al., 1997; Yokoyama et al., 1998; Ragazzini et al., 1999). Em particular, Benassi et al. (1999) analisaram 39 OSs de alto grau e observaram que a expressão de

CDK4 foi moderada a forte em 29 casos (74%) e foi associada com metástase e pobre prognóstico.

Outros têm mostrado que maior amplificação de MDM2 em OS parosteal e que amplificação de SAS ocorreu predominantemente em OSs superficiais (Nakayama et al., 1995; Noble-Topham et al., 1996). Estes autores sugeriram que osteossarcomas superficiais podem ser geneticamente diferentes dos osteossarcomas intramedulares de alto grau de malignidade (Noble-Topham et al., 1996). Em suporte a este conceito, Wunder et al. (1999) indicaram que CDK4 e SAS foram co-amplificados em 6 dos 6 OSs parosteais e MDM2 foi amplificado em 4 casos. Por outro lado, somente 2 dos 16 casos de osteossarcoma intramedular mostraram amplificação de SAS. Além disso, eles observaram que amplificação e aumento da expressão genética não foram associados com metástase ou progressão do tumor. No presente estudo, associação foi identificada com tumores de alto grau de malignidade, entretanto, não houve correlação com recorrência, metástase e prognóstico mesmo porque todos os pacientes estavam vivos e livres de doença desde o tratamento.

Em conclusão, nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores em OS de ossos longos, os quais indicam que a região q13-15 do cromossomo 12

tem um importante papel na gênese dos osteossarcomas. Entretanto, outras investigações com grandes séries são necessárias para melhor entendimento dos mecanismos moleculares e relações entre as características clinico-patológicas e alterações destes genes nos osteossarcomas dos maxilares.

Referências bibliográficas

- Agarwal SK. Proteases cathepsins- a view. *Biochem Educ* 1990;18:67-72.
- Altmeyer A, Maki RG, Feldweg AM, Heike M, Protopopov VP, Masur SK, Srivastava PK. Tumor-specific cell surface expression of the-KDEL containing, endoplasmic reticular heat shock protein gp96. *Int J Cancer* 1996;69:340-9.
- Ambrosch P, Kron M, Fisher G, Brinck U. Micrometastases in carcinoma of the upper aerodigestive tract: detection, risk of metastasizing, and prognostic value of depth of invasion. *Head Neck* 1995;17:473-9.
- Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987;95:229-49.
- Antman KH, Eilber FR, Shiu MH. Soft tissue sarcomas: current trends in diagnosis and management. *Curr Probl Cancer* 1989;13:337-67.
- Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* 1993;12:461-8.

- Batsakis JG: Tumors of the head and neck: clinical and pathological considerations. Baltimore: Williams & Wilkins, 1979, p 144.
- Bekri S, Adelaide J, Merscher S, Grosgeorge J, Caroli-Bosc F, Perucca-Lostanlen D, Kelley PM, Pebusque MJ, Theillet C, Birnbaum D, Gaudray P. Detailed map of a region commonly amplified at 11q13-->q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 1997;79:125-31.
- Benassi MS, Molendini L, Gamberi G, Ragazzini P, Sollazzo MR, Merli M, Asp J, Magagnoli G, Balladelli A, Bertoni F, Picci P. Alteration of pRb/p16/cdk4 regulation in human osteosarcoma. *Int J Cancer* 1999;84:489-93.
- Bergman SA, Ord RA, Rothman M. Accuracy of clinical examination versus computed tomography in detecting occult lymph node involvement in patients with oral epidermoid carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:1236-9.
- Berner JM, Forus A, Elkahloun A, Meltzer PS, Fodstad O, Myklebost O. Separate amplified regions encompassing CDK4 and MDM2 in human sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;17:254-9.
- Bertoni F, Dallera P, Bacchini P, Marchetti C, Campobassi A. The Istituto Rizzoli-Beretta experience with osteosarcoma of the jaw. *Cancer* 1991;68:1555-63.

- Bockmuhl U, Wolf G, Schmidt S, Schwendel A, Jahnke V, Dietel M, Petersen I. Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head Neck* 1998;20:145-51.
- Bongers V, Konings CH, Grijpma AM, Steen I, Braakhuis BJ, Snow GB. Serum proteinase activities in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res* 1995;15:2763-6
- Budihna M, Strojan P, Smid L, Skrk J, Vrhovec I, Zupevc A, Rudolf Z, Zargi M, Krasovec M, Svetic B, Kopitar-Jerala N, Kos J. Prognostic value of cathepsins B, H, L, D and their endogenous inhibitors stefins A and B in head and neck carcinoma. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1996;377:385-90.
- Caron AS, Hajdu SI, Strong EW. Osteogenic sarcoma of the facial and cranial bones. A review of forty-three cases. *Am J Surg* 1971;122:719-25.
- Clark JL, Unni KK, Dahlin DC, Devine KD. Osteosarcoma of the jaw. *Cancer* 1983;51:2311-6.
- Clarke EP, Cates GA, Ball EH, Sanwal BD. A collagen-binding protein in the endoplasmic reticulum of myoblasts exhibits relationship with serine protease inhibitors. *J Biol Chem* 1991;266:17230-5
- deFries HO, Perlin E, Leibel SA. Treatment of osteogenic sarcoma of the mandible. *Arch Otolaryngol* 1979;105:358-9.

- Delebecq TJ, Porte H, Zerimech F, Copin MC, Gouyer V, Dacquembronne E, Balduyck M, Wurtz A, Huet G. Overexpression level of stromelysin 3 is related to the lymph node involvement in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:1086-92.
- Delgado R, Maafs E, Alfeiran A, Mohar A, Barrera JL, Zinser J, Beltran A. Osteosarcoma of the jaw. *Head Neck* 1994;16:246-52.
- Elkahloun AG, Bittner M, Hoskins K, Gemmill R, Meltzer PS. Molecular cytogenetic characterization and physical mapping of 12q13-15 amplification in human cancers. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;17:205-14.
- Ewen ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 1993;73:487-97.
- Farr HW, Goldfarb PM, Farr CM. Epidermoid carcinoma of the mouth and pharynx at Memorial Sloan Kettering Cancer Center, 1965 to 1969. *Am J Surg* 1980;140:563-7.
- Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 1992;51:613-9.
- Foekens JA, Kos J, Peters HA, Krasovec M, Look MP, Cimerman N, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putten WL, Klijn JG. Prognostic

- significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1013-21.
- Freedman MS, Buu NN, Ruijs TC, Williams K, Antel JP. Differential expression of heat shock proteins by human glial cells. *J Neuroimmunol* 1992;41:231-8.
- Friedrich B, Jung K, Lein M, Turk I, Rudolph B, Hampel G, Schnorr D, Loening SA. Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue. *Eur J Cancer* 1999;35:138-44.
- Gandour-Edwards R, Trock BJ, Gumerlock P, Donald PJ. Heat shock protein and p53 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118:610-5.
- Garrington GE, Scofield HH, Cornyn J, Hooker SP. Osteosarcoma of the jaws. Analysis of 56 cases. *Cancer* 1967;20:377-91.
- Goorin AM, Abelson HT, Frei E. Osteosarcoma: fifteen years later. *N Engl J Med* 1985;313:1637-43.
- Ha PK, Eisele DW, Frassica FJ, Zahurak ML, McCarthy EF. Osteosarcoma of the head and neck: a review of the Johns Hopkins experience. *Laryngoscope* 1999;109:964-9.

- Harbeck N, Alt U, Berger U, Kates R, Kruger A, Thomssen C, Janicke F, Graeff H, Schmitt M. Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer. *Int J Biol Markers* 2000;15:79-83.
- Hebert C, Norris K, Della Coletta R, Reynolds M, Ordonez J, Sauk JJ. Cell surface colligin/Hsp47 associates with tetraspanin protein CD9 in epidermoid carcinoma cell lines. *J Cell Biochem* 1999;73:248-58.
- Hermanek P, Sobin LH: TNM classification of malignant tumors. Berlin: Springer-Verlag, 1987, p 13.
- Hosal AS, Unal OF, Ayhan A. Possible prognostic value of histopathologic parameters in patients with carcinoma of the oral tongue. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1998;255:216-9.
- Huvos AG. Bone tumors: diagnosis, treatment, and prognosis. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders 1991:88-156.
- Jain N, Brickenden A, Ball EH, Sanwal BD. Inhibition of procollagen I degradation by colligin: a collagen-binding serpin. *Arch Biochem Biophys* 1994;314:23-30.

- Jankowski SA, Mitchell DS, Smith SH, Trent JM, Meltzer PS. SAS, a gene amplified in human sarcomas, encodes a new member of the transmembrane 4 superfamily of proteins. *Oncogene* 1994;9:1205-11.
- Jankowski SA, De Jong P, Meltzer PS. Genomic structure of SAS, a member of the transmembrane 4 superfamily amplified in human sarcomas. *Genomics* 1995;25:501-6.
- 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 sarcomas: tumor specificity and relationship with the RB gene mutation. *Anticancer Res* 1998;18:2317-21.
- Karlseder J, Zeillinger R, Schneeberger C, Czerwenka K, Speiser P, Kubista E, Birnbaum D, Gaudray P, Theillet C. Patterns of DNA amplification at band q13 of chromosome 11 in human breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9:42-8.
- 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.

- Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 1993;7:331-42.
- Kaur J, Srivastava A, Ralhan R: Prognostic significance of p53 protein overexpression in betel- and tobacco-related oral oncogenesis. *Int J Cancer* 1998;79:370-5.
- Khatib ZA, Matsushime H, Valentine M, Shapiro DN, Sherr CJ, Look AT. Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer Res* 1993;53:5535-41.
- Kirschke H, Eerola R, Hopsu-Havu VK, Bromme D, Vuorio E. Antisense RNA inhibition of cathepsin L expression reduces tumorigenicity of malignant cells. *Eur J Cancer* 2000;36:787-95.
- Kos J, Smid A, Krasovec M, Svetic B, Lenarcic B, Vrhovec I, Skrk J, Turk V. Lysosomal proteases cathepsins D, B, H, L and their inhibitors stefins A and B in head and neck cancer. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995;376:401-5.
- Kos J, Stabuc B, Schweiger A, Krasovec M, Cimerman N, Kopitar-Jerala N, Vrhovec I. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1997;3:1815-22.

- Kos J, Lah TT. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep* 1998;5:1349-61.
- Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, Santos RL, Silva JF, Magrin J. Prognostic significance of the distribution of neck node metastasis from oral carcinoma. *Head Neck* 2000;22:207-14.
- Krecicki T, Siewinski M. Serum cathepsin B-like activity as a potential marker of laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992;249:293-5.
- Ladanyi M, Cha C, Lewis R, Jhanwar SC, Huvos AG, Healey JH. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res* 1993;53:16-8.
- Lah TT, Cercek M, Blejec A, Kos J, Gorodetsky E, Somers R, Daskal I. Cathepsin B, a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: comparison with cathepsin D, cathepsin L, and other clinical indicators. *Clin Cancer Res* 2000a;6:578-84.
- Lah TT, Kalman E, Najjar D, Gorodetsky E, Brennan P, Somers R, Daskal I. Cells producing cathepsins D, B, and L in human breast carcinoma and their association with prognosis. *Hum Pathol* 2000b;31:149-60.

- 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;53:2231-4.
- Ledakis P, Tester WT, Rosenberg N, Romero-Fischmann D, Daskal I, Lah TT. Cathepsins D, B, and L in malignant human lung tissue. *Clin Cancer Res* 1996;2:561-8.
- Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994;69:409-16.
- Lewis M, Perl A, Som PM, Urken ML, Brandwein MS. Osteogenic sarcoma of the jaw. A clinicopathologic review of 12 patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:169-74.
- Lindberg R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1972;29:1446-9.
- Lonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M. p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. *Cancer* 1997;79:1541-7.

- Magnano M, Bussi M, De Stefani A, Milan F, Lerda W, Ferrero V, Gervasio F, Ragona R, Gabriele P, Valente G. Prognostic factors for head and neck tumor recurrence. *Acta Otolaryngol* 1995;115:833-8.
- 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;250:1233-8.
- Mark RJ, Sercarz JA, Tran L, Dodd LG, Selch M, Calcaterra TC. Osteogenic sarcoma of the head and neck. The UCLA experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;117:761-6.
- Mason RW, Johnson DA, Barrett AJ, Chapman HA. Elastinolytic activity of human cathepsin L. *Biochem J* 1986;233:925-7.
- 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;14:2066-76.
- Meltzer PS, Jankowski SA, 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.
- Meltzer PS. MDM2 and p53: a question of balance. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1265-6.
- Miller CW, Aslo A, Won A, Tan M, Lampkin B, Koeffler HP. Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:559-65.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992;69:1237-45.
- Moncur JT, Park JP, Memoli VA, Mohandas TK, Kinlaw WB. The "Spot 14" gene resides on the telomeric end of the 11q13 amplicon and is expressed in lipogenic breast cancers: implications for control of tumor metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:6989-94.
- Morino M, Tsuzuki T, Ishikawa Y, Shirakami T, Yoshimura M, Kiyosuke Y, Matsunaga K, Yoshikumi C, Saijo N. Specific expression of HSP47 in human tumor cell lines in vitro. *In Vivo* 1997;11:17-21.
- Nakayama T, Toguchida J, Wadayama B, Kanoe H, Kotoura Y, Sasaki MS. MDM2 gene amplification in bone and soft-tissue tumors: association with

- tumor progression in differentiated adipose-tissue tumors. *Int J Cancer* 1995;64:342-6.
- Nilbert M, Rydholm A, Mitelman F, Meltzer PS, Mandahl N. Characterization of the 12q13-15 amplicon in soft tissue tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1995;83:32-6.
- Noble-Topham SE, Burrow SR, Eppert K, Kandel RA, Meltzer PS, Bell RS, Andrulis IL. SAS is amplified predominantly in surface osteosarcoma. *J Orthop Res* 1996;14:700-5.
- Noguchi M, Kido Y, Kubota H, Kinjo H, Kohama G. Prognostic factors and relative risk for survival in N1-3 oral squamous cell carcinoma: a multivariate analysis using Cox's hazard model. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37:433-7.
- Oda D, Bavisotto LM, Schmidt RA, McNutt M, Bruckner JD, Conrad EU 3rd, Weymuller EA Jr. Head and neck osteosarcoma at the University of Washington. *Head Neck* 1997;19:513-23.
- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992;358:80-3.

- Ono I, Ebihara S, Saito H, Yoshizumi T. Correlation between prognosis and degree of lymph node involvement in carcinoma of the head and neck. *Auris Nasus Larynx* 1985;12 Suppl 2:S85-9.
- Plebani M, Herszenyi L, Cardin R, Roveroni G, Carraro P, Paoli MD, Rugge M, Grigioni WF, Nitti D, Naccarato R. Cysteine and serine proteases in gastric cancer. *Cancer* 1995;76:367-75.
- Plehn A, Gunther D, Aurich H, Hoang-Vu C, Weber E. Influence of proliferation, differentiation and dedifferentiation factors on the expression of the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L (CL) in thyroid cancer cell lines. *Adv Exp Med Biol* 2000;477:487-95.
- Ragazzini P, Gamberi G, Benassi MS, Orlando C, Sestini R, Ferrari C, Molendini L, Sollazzo MR, Merli M, Magagnoli G, Bertoni F, Bohling T, Pazzagli M, Picci P. Analysis of SAS gene and CDK4 and MDM2 proteins in low-grade osteosarcoma. *Cancer Detect Prev* 1999;23:129-36.
- Reifenberger G, Ichimura K, Reifenberger J, Elkahloun AG, Meltzer PS, Collins VP. Refined mapping of 12q13-q15 amplicons in human malignant gliomas suggests CDK4/SAS and MDM2 as independent amplification targets. *Cancer Res* 1996;56:5141-5.

- Sauk JJ, Smith T, Norris K, Ferreira L. Hsp47 and the translation-translocation machinery cooperate in the production of alpha 1(I) chains of type I procollagen. *J Biol Chem* 1994;269:3941-6.
- Sauk JJ, Norris K, Hebert C, Ordonez J, Reynolds M. Hsp47 binds to the KDEL receptor and cell surface expression is modulated by cytoplasmic and endosomal pH. *Connect Tissue Res* 1998;37:105-19.
- Schaffer JE, Lodish HF. Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 1994;79:427-36.
- Schuuring E, Verhoeven E, Mooi WJ, Michalides RJ. Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene* 1992;7:355-61.
- Shingaki S, Suzuki I, Kobayashi T, Nakajima T. Predicting factors for distant metastases in head and neck carcinomas: an analysis of 103 patients with locoregional control. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;54:853-7.
- Shirakami T, Tsuzuki T, Morino M, Kiyosuke YI, Yoshimura M, Yoshikumi C, Okada F, Hosokawa M. Decreased expression of HSP47 in highly malignant mouse fibrosarcoma. *In Vivo* 1995;9:513-8.

- Smeele LE, Kostense 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;15:363-7.
- Smeele LE, Leemans CR, Reid CB, Tiwari R, Snow GB. Neck dissection for advanced lymph node metastasis before definitive radiotherapy for primary carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 2000;110:1210-4.
- Smid L, Strojan P, Budihna M, Skrk J, Vrhovec I, Zargi M, Kos J. Prognostic value of cathepsins B, D and steffins A and B in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol Suppl* 1997;1:150-3.
- Sommer T, Olofsson J. Significance of p53, PCNA and Ki-67 in the prognosis of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Laryngorhinootologie* 1997;76:189-96.
- Spiro RH, Guillaumondegui O Jr, Paulino AF, Huvos AG. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck* 1999;21:408-13.
- Staibano S, Mignogna MD, Lo Muzio L, Di Alberti L, Di Natale E, Lucariello A, Mezza E, Bucci E, DeRosa G. Overexpression of cyclin-D1, bcl-2, and bax proteins, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and DNA-ploidy in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Hum Pathol* 1998;29:1189-94.

- Stern WB, Silver CE, Zeifer BA, Persky MS, Heller KS. Computed tomography of the clinically negative neck. *Head Neck* 1990;12:109-13.
- Strojan P, Budihna M, Smid L, Svetic B, Vrhovec I, Kos J, Skrk J. Prognostic significance of cysteine proteinases cathepsins B and L and their endogenous inhibitors stefins A and B in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2000;6:1052-62.
- Take Y, Umeda M, Teranobu O, Shimada K. Lymph node metastases in hamster tongue cancer induced with 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene: association between histological findings and the incidence of neck metastases, and the clinical implications for patients with tongue cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37:29-36.
- Takechi H, Hirayoshi K, Nakai A, Kudo H, Saga S, Nagata K. Molecular cloning of a mouse 47-kDa heat-shock protein (HSP47), a collagen-binding stress protein, and its expression during the differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Eur J Biochem* 1992;206:323-9.
- Takemoto H, Yoshimori T, Yamamoto A, Miyata Y, Yahara I, Inoue K, Tashiro Y. Heavy chain binding protein (BiP/GRP78) and endoplasmic reticulum chaperonin are exported from the endoplasmic reticulum in rat exocrine pancreatic cells, similar to protein disulfide-isomerase. *Arch Biochem Biophys* 1992;296:129-36.

- Thomssen C, Schmitt M, Goretzki L, Oppelt P, Pache L, Dettmar P, Janicke F, Graeff H. Prognostic value of the cysteine proteases cathepsins B and cathepsin L in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1:741-6.
- Tsai ST, Jin YT. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1995;24:313-5.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985;228:1440-3.
- Ullrich SJ, Robinson EA, Law LW, Willingham M, Appella E. A mouse tumor-specific transplantation antigen is a heat shock-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:3121-5.
- Umeda M, Yokoo S, Take Y, Omori A, Nakanishi K, Shimada K. Lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlation between histologic features and the prevalence of metastasis. *Head Neck* 1992;14:263-72.
- van den Brekel MW, Castelijns JA, Stel HV, Luth WJ, Valk J, van der Waal I, Snow GB. Occult metastatic neck disease: detection with US and US-guided fine-needle aspiration cytology. *Radiology* 1991;180:457-61.

- Vanbuskirk A, Crump BL, Margoliash E, Pierce SK. A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family. *J Exp Med* 1989;170:1799-809.
- 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;19:90-3.
- Vikram B, Strong EW, Shah JP, Spiro R. Failure at distant sites following multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg* 1984;6:730-3.
- 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. Society of Head and Neck Surgeons Committee on Research. *Head Neck* 1992;14:1-7.
- Wilson GR, McLean NR, Chippindale A, Campbell RS, Soames JV, Reed MF. The role of MRI scanning in the diagnosis of cervical lymphadenopathy. *Br J Plast Surg* 1994;47:175-9.
- Woolgar JA, Scott J. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head Neck* 1995;17:463-72.

- Wunder JS, Eppert K, Burrow SR, Gogkoz N, Bell RS, Andrulis. Co-amplification and overexpression of CDK4, SAS and MDM2 occurs frequently in human parosteal osteosarcomas. *IL Oncogene* 1999;18:783-8.
- Yokoyama R, Schneider-Stock R, Radig K, Wex T, Roessner A. Clinicopathologic implications of MDM2, p53 and K-ras gene alterations in osteosarcomas: MDM2 amplification and p53 mutations found in progressive tumors. *Pathol Res Pract* 1998;194:615-21.