



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**EXPRESIÓN DE FACTORES DE PROLIFERACIÓN
Y PROTEINAS REGULADORAS DEL CICLO
CELULAR EN OSTEOSARCOMAS EN NIÑOS.**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
QUE PRESENTA:
MARÍA GUADALUPE JAZMÍN
DE ANDA GONZÁLEZ
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
ESPECIALISTA EN
PATOLOGÍA PEDIÁTRICA**



**TUTOR DE TESIS:
DRA. BEATRIZ YOLANDA DE LEÓN BOJORGE**

MÉXICO, D.F.

2008

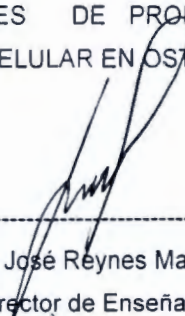
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**EXPRESIÓN DE FACTORES DE PROLIFERACIÓN Y PROTEINAS
REGULADORAS DEL CICLO CELULAR EN OSTEOSARCOMAS EN NIÑOS.**

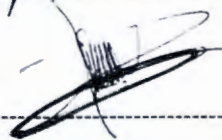
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA
MARÍA GUADALUPE JAZMÍN DE ANDA GONZÁLEZ
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA
PATOLOGIA PEDIATRICA

TUTOR DE TESIS: DRA. BEATRIZ YOLANDA DE LEÓN BOJORGE

EXPRESIÓN DE FACTORES DE PROLIFERACIÓN Y PROTEÍNAS
REGULADORAS DEL CICLO CELULAR EN OSTEOSARCOMAS EN NIÑOS.



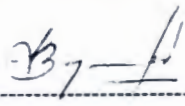
Dr. José Reyes Manzur
Director de Enseñanza




Dra. Mirella Vázquez Rivera
Jefe del Departamento de Pre y Posgrado



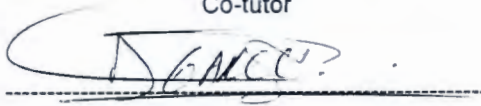
Dra. Beatriz Yolanda de León Bojorge
Tutor del Trabajo de Fin de Curso



Dra. Leticia Bornstein Quevedo
Co-tutor



Dr. Carlos Calderón Elvir
Co-tutor



M.C. Francisco J. García Vázquez
Co-tutor

DEDICATORIA

Una tesis es el trabajo final con la que se busca obtener un grado académico, en mi caso, esta tesis significa la culminación de una preparación que inició con el conocimiento y con mi formación como patóloga pediatra.

Quise dedicar este trabajo en primer lugar a Jorge, tan importante en mi vida personal, como profesional, sin él, yo hubiese renunciado sin remedio durante el primer año de especialidad, hubiese abandonado mis cursos de italiano, y quizás nunca hubiese vivido esa increíble experiencia que fue la estancia en Milán, Italia, al lado de uno de los más grandes exponentes de la patología: el Dr. Juan Rosai. Me dio la fortaleza, los consejos necesarios, el apoyo y la seguridad suficiente para salir adelante en esos momentos que compartimos juntos, pero sobre todo, me dio la esperanza y la ilusión de una vida diferente.

En segundo lugar, quisiera dedicar este trabajo a las personas que estuvieron cerca de mí día a día, que ayudaron a forjar mi carácter profesional y que me enseñaron a apreciar la calidad de un trabajo bien hecho, me refiero a mis técnicas: Isabel, Erica, Doña Mary y Lalo. A mis secretarias: Elizabeth, Blanquita, Carmelita y Cristina, pero sobre todo, a mis técnicos de autopsias, que aman tanto su trabajo como yo, y que me enseñaron a valorarlo más de lo que yo pensaba: Don Fede, Don Silver, Don Eusebio, Don Hugo y José Luis.

Este trabajo no estaría completo si no agradeciera sus enseñanzas y su apoyo en el ámbito académico y profesional a mis profesores: El Dr. López Corella, la Dra. Ridaura, el Dr. Carrasco, el Dr. Rodríguez, pero sobre todo, a mis

dos tutores y asesores de tesis, sin las cuáles este trabajo no hubiese podido ser concluido: la Dra. De León, y Pancho.

Al Dr. Carlos Calderón, quién me enseñó la importancia de no darse por vencido en ningún momento, y que más de una vez me ha enseñado el amor a la vida, a los seres queridos, y el apoyo a mis propios compañeros de trabajo.

A mi propia familia a la que le robé infinidad de veces tiempo de estar a su lado, a mamá que ya no está conmigo en estos momentos, pero sé que está orgullosa de que al fin haya terminado este trabajo, a papá, a mis hermanos, a mi hermana y a mis dos sobrinas por comprender muchas veces lo que esto significaba para mí, y por apoyarme en todo momento.

Pero sobre todo, quiero dedicarle este trabajo a Héctor, quien ha estado a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida, quién me dio la mano para levantarme cuando estaba caída, de quién pude tomarme de su brazo para continuar adelante, quién me ha prestado su hombro para llorar en tantas ocasiones, quién ha reído conmigo en los momentos de felicidad, ha celebrado conmigo los momentos de gloria, ha escuchado y callado en los momentos de tristeza y llanto, pero sobre todo, porque me ha enseñado a creer nuevamente en las personas, en los valores morales, en la vida, y me ha enseñado a creer nuevamente en mi misma cuando creí que todo había terminado... No tengo palabras para darle las gracias, ya que sin él, este trabajo nunca hubiese sido concluido...

INDICE

RESÚMEN	6
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
JUSTIFICACIÓN.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	19
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN.....	30
CONCLUSIONES.....	33
BIBLIOGRAFÍA.....	34
ANEXOS.....	38

RESÚMEN

Antecedentes. El osteosarcoma es la neoplasia maligna ósea más frecuente en pediatría. La enfermedad recurrente y metastásica es la principal causa de mortalidad a pesar del tratamiento médico y quirúrgico. Algunos informes han relacionado la expresión de factores de proliferación, proteínas reguladoras del ciclo celular y antioncogenes con el pronóstico de estos pacientes. El objetivo del estudio es conocer la expresión de estos marcadores con inmunohistoquímica y su posible relación pronóstica.

Material y Métodos. Del archivo de patología quirúrgica se obtuvieron todos los casos con diagnóstico de osteosarcoma entre 1990 y 2004. Se revisaron histológicamente y se realizó inmunohistoquímica para factores de proliferación, proteínas reguladoras de ciclo celular y antioncogenes.

Resultados. Se identificaron 69 pacientes, 34(49.2%) hombres y 35(50.8%) mujeres con edad mediana de 12 años. La localización más frecuente fue el tercio distal de fémur (47.8%). Cuarenta y dos(60.8%) fueron osteosarcomas osteoblásticos, 9(13%) condroblásticos, 1(1.5%) fibroblástico, 11(16%) con morfología poco usual y 6(8.6%) con morfología combinada. Se identificó sobreexpresión de Ki-67, bcl-2, ciclina D1, pRb y p53 en 94, 85, 67, 56 y 30.7% de casos, respectivamente. Solamente Ki-67, ciclina D1 y pRb mostraron positividad frecuente en >50% de células neoplásicas. Sin embargo, la correlación entre variables clínicas y la expresión de factores de proliferación y proteínas del ciclo celular no mostró significado estadístico. Todos los casos resultaron negativos para HER2.

Conclusiones. En esta serie, la localización más frecuente de osteosarcomas fue en fémur(47.8%) y el subtipo histológico más común el osteosarcoma osteoblástico(60.8%). La frecuencia de metástasis al momento del diagnóstico es elevada (30 pacientes, 43.5%) y común en pacientes con morfología combinada. Aunque se identificó sobreexpresión de factores de proliferación, proteínas reguladoras de ciclo celular y antioncogenes en osteosarcomas en niños, no se observó correlación con enfermedad metastásica.

ABSTRACT

Background. Osteosarcoma is the most frequent bone tumor in pediatric patients. Recurrent disease and metastases are the main cause of mortality in spite of medical and surgical treatment. Some reports have related the expression of proliferations factors, expression, cell cycle proteins and anti-oncogenes with the prognosis of these patients. The aim of this study was to analyze the expression of these markers by immunohistochemistry and its relation to prognosis.

Material and methods. From the surgical pathology archive, all the cases with morphologic diagnosis of osteosarcoma, between 1990 and 2004 were obtained. The pathologic diagnosis was confirmed and immunohistochemistry was performed for proliferation markers, cell cycle proteins and anti-oncogenes.

Results. Sixty nine patients were identified, 34(49.2%) men and 35(50.8%) women with average age of 12y. The most frequent site was the distal femur (47.8%). Forty-two(60.8%) were osteoblastic osteosarcomas, 9(13%) chondroblastic, 1(1.5%) fibroblastic and 11(16%) with unusual and 6(8.6%)combined morphology. Over-expression of Ki-67, bcl-2, cyclin D1, pRb and p53 were identified in 94, 85, 67, 56 and 30% of cases, respectively. Only Ki-67, cyclin D1 and pRb were positive in >50% of neoplastic cells. Nevertheless, there was no correlation between clinical variables and over-expression of proliferation markers and cell cycle proteins. All cases were HER2 negative.

Conclusions. In this series, the most frequent site involved was the femur(47.8%) and osteoblastic osteosarcoma(60.8%) the most common histological type. The frequency of metastasis at diagnostic was high (30 patients, 43.5%) and common in patients with combined morphology. Even though over-expression of proliferation markers cell cycle proteins and an:ioncogenes was identified, the correlation with metastatic disease couldn't be demonstrated.

INTRODUCCIÓN

El osteosarcoma es la neoplasia ósea más frecuente en niños y adolescentes. Se define como la neoplasia maligna de hueso en la cuál las células mesenquimatosas neoplásicas tienen la capacidad de producir osteoide o hueso inmaduro.

En EE.UU., la incidencia de tumores óseos malignos es poco frecuente, se ha estimado en 8.7 casos por millón de niños y adolescentes menores de 20 años de edad, representando 650 a 700 casos nuevos de cáncer óseo por año. (1) En México, las tasas de morbilidad y mortalidad por osteosarcoma son de 0.6 y 0.8% respectivamente. En el Instituto Nacional de Pediatría (INP) ocupa el sexto lugar, en frecuencia, en el Servicio de Oncología y el segundo lugar en el servicio de Cirugía Oncológica. Es la segunda entidad quirúrgica oncológica atendida de todos los tumores óseos. (2)

EPIDEMIOLOGIA

Tiene una distribución bimodal, con incremento de la frecuencia en la segunda y quinta décadas de la vida, el primer pico de frecuencia coincide con el pico de crecimiento óseo en los adolescentes. El 60% de los casos se detecta entre 10 y 30 años, con relación hombre: mujer de 3:1. (1, 2, 3,4)

DIAGNÓSTICO

La evaluación de los pacientes con osteosarcoma inicia con la historia clínica, el examen físico y placas radiográficas. La mayoría de los pacientes se presenta con dolor y aumento de volumen del área afectada usualmente asociada a un traumatismo secundario a algún ejercicio vigoroso. Los pacientes generalmente tienen síntomas por 3 a 4 meses antes de realizarse el diagnóstico. (1,3) Radiológicamente el osteosarcoma produce lesiones líticas o escleróticas. Puede estar limitado al espacio medular, pero la corteza puede ser afectada y destruida con límites poco precisos. En algunos casos el tumor puede extenderse a través de la cortical y puede variar en grados de mineralización. En etapa inicial la radiografía muestra una zona aislada de penetración en la cortical, con expansión a los tejidos blandos. La superficie de la neoplasia presenta reacción periosteal que puede ser en forma paralela al hueso de neoformación. Ocasionalmente el tumor forma estrías radiadas perpendiculares, lo cuál recibe el nombre de "signo del sol naciente". Otro signo radiológico es el "Triángulo de Codman" que se identifica cuando el tumor crece en la superficie del hueso, induciendo una reacción periosteal. (3)

Los parámetros de laboratorio que han sido considerados como auxiliares del diagnóstico son los niveles de fosfatasa alcalina sérica e intralesional, así como los niveles séricos elevados de deshidrogenasa láctica.(2)

Los principales sitios de afección son la metáfisis de huesos largos como: fémur distal, tibia proximal y húmero proximal. También puede ocurrir en huesos del esqueleto axial, con mayor frecuencia en la pelvis (<10% en el grupo pediátrico) (3,4)

CLASIFICACIÓN

El osteosarcoma convencional es un sarcoma de alto grado y se clasifica en tres categorías principales dependiendo de la producción de matriz predominante: osteoblástico, condroblástico y fibroblástico. (5)

La neoplasia puede variar desde áreas hipercelulares con escasa producción de osteoide a áreas con escasa celularidad y abundante osteoide con osificación. La producción de matriz ósea tumoral comienza con la elaboración de una matriz colagenosa fibrilar. En estadios tempranos se presenta el depósito de una sustancia eosinofílica fibrilar entre pequeños grupos de células neoplásicas. Posteriormente, grandes áreas de osteoide producen un patrón en el cuál la célula neoplásica es rodeada por una sustancia gruesa, fibrilar, que puede mostrar mineralización. La osificación es producida por nidos de osteoide que separan células tumorales y muestran depósitos de calcificación. De manera general en el osteosarcoma osteoblástico predomina la matriz ósea y formación de osteoide. Las células neoplásicas son osteoblastos de aspecto epitelioides o plasmocitoides, con células de diferente morfología que va de pequeñas a cúbicas con un número variable de células gigantes multinucleadas. La matriz puede variar de áreas densas de osteoide y hueso laminado, a áreas de osteoide fibrilar. El osteosarcoma condroblástico tiene una matriz predominantemente condroide, usualmente recuerda cartílago hialino con células neoplásicas dentro de los depósitos de osteoide. El osteosarcoma fibroblástico se compone de células neoplásicas fusiformes con escasa producción de osteoide. (3)

Adicional al osteosarcoma de tipo convencional y sus subtipos que reconoce la Organización Mundial de la Salud, existen otras variantes: el intramedular, paraosteal, periosteal, de bajo grado, intracortical, extraóseo, semejante a histiocitoma fibroso maligno, telangiectásico, de células pequeñas y rico en células gigantes. (5,6) De estas variantes, se ha informado que el osteosarcoma de células pequeñas y el semejante a histiocitoma fibroso maligno se asocian a pronóstico desfavorable. (7,8)

TRATAMIENTO

Los protocolos actuales de tratamiento para el osteosarcoma usan una combinación de quimioterapia sistémica y cirugía, mejorando la supervivencia global en 15 a 20%, y con supervivencia libre de enfermedad del 70% a 5 años en pacientes que no tienen enfermedad metastásica al momento del diagnóstico. (1, 4,9) Una alternativa para tratamiento es el intensificar la quimioterapia prequirúrgica con el subsecuente incremento en el porcentaje de pacientes con buena respuesta histológica pero en los cuáles no ha habido cambio en el porcentaje de supervivencia libre de enfermedad. Existe la necesidad de poder estratificar a los pacientes al momento de diagnóstico en pacientes de alto y bajo riesgo con la capacidad de poder emplear quimioterapia agresiva en pacientes con factores de alto riesgo, y minimizar en pacientes de bajo riesgo los efectos secundarios por toxicidad.

FACTORES PRONOSTICOS

Hasta el momento, el factor pronóstico de mayor impacto al momento del diagnóstico es la presencia o ausencia de metástasis. Aproximadamente, el 15 a 20% de los pacientes presentan metástasis al momento del diagnóstico, lo cual se asocia a pronóstico desfavorable. Otros factores explorados con limitada capacidad pronóstica son: edad, género, duración de los síntomas, extensión de la enfermedad al momento de diagnóstico y sitio del tumor primario. Los parámetros de laboratorio que han sido considerados como significativos son los niveles de fosfatasa alcalina sérica e intralesional, así como los niveles de deshidrogenasa láctica sérica.

De los factores histológicos considerados como pronósticos el más importante es la respuesta histológica del tumor a la quimioterapia neoadyuvante, además de el tipo histológico, grado de diferenciación, afección a partes blandas, tamaño del tumor y contenido de DNA. (1, 4, 10)

En la actualidad la capacidad de predecir el pronóstico en osteosarcomas es limitada, ya que los factores utilizados no son suficientes para predecir el curso de la enfermedad. Con el fin de encontrar otros factores pronósticos asociados a la biología tumoral, se han estudiado alteraciones genéticas, mutaciones en oncogenes, protooncogenes, así como proteínas del ciclo celular relacionadas a resistencia a la quimioterapia.

En varios trabajos se ha estudiado el papel de la familia de proteínas del bcl-2, las cuáles regulan varios pasos en la apoptosis. Algunos miembros de ésta familia, incluyendo bcl-2, bloquean la muerte celular, mientras que otros miembros, como Bax, promueven la apoptosis. El estudio de inmunohistoquímica de la

expresión de bcl-2 difiere en las diferentes neoplasias, por ejemplo: en cáncer de mama con metástasis se ha encontrado falta de expresión y se asociado a mal pronóstico, mientras que en melanoma maligno metastático se ha encontrado una importante expresión. En osteosarcomas en niños, la expresión moderada o intensa de bcl-2 ha sido informada hasta en un 81%, sin encontrar aún significado clínico. (11)

ANOMALÍAS GENÉTICAS

Las alteraciones genéticas investigadas en osteosarcomas se encuentran agrupadas en dos categorías: 1) translocaciones recíprocas con cariotipos balanceados y alteraciones en genes supresores y, 2) cariotipos no balanceados con alteraciones del gen p53 y del retinoblastoma (Rb).

ALTERACIONES EN GENES SUPRESORES TUMORALES

Las mutaciones en el gen p53 son las alteraciones más frecuentes encontradas en tumores malignos. p53 ha sido implicado como mediador en el ciclo celular, en particular en la muerte celular programada incluyendo la apoptosis inducida por radiación y quimioterapia. En osteosarcomas, se han identificado alteraciones del p53 en 18 a 42% de casos. (1,12) La sobreexpresión de p53 no se ha relacionado con un alto índice de proliferación, sin embargo, si se ha asociado a la edad de los pacientes. Esto es importante, ya que en la edad pediátrica, la expresión de p53 es negativa, por el contrario, en adultos, es positiva con $p < 0.04$. Según Gokgoz las alteraciones en p53 se llevan a cabo antes de desarrollarse metástasis más que en un estadio de progresión del

tumor, contrario a los hallazgos reportados por Ferrari. Este estudio informó que la expresión de p53 no tiene significado pronóstico con respecto a la supervivencia. (11, 12,13)

En osteosarcomas, algunos oncogenes como *c-myc*, *c-raf*, *c-myb*, *c-met*, *c-sis*, y *c-gli* se encuentran sobreexpresados. (3,10) También, se ha encontrado evidencia de alteraciones en la fase G1 del ciclo celular, 29% de casos han mostrado pérdida de la expresión de pRB y 16% pérdida de la expresión de p16. También, se ha informado una correlación inversa entre la pérdida de la expresión de pRB y p16. Estos datos, fueron independientes del sitio de tumor, presencia de metástasis al momento de diagnóstico y porcentaje de necrosis tumoral en el espécimen de resección. En análisis univariados se ha identificado correlación con significado estadístico entre escasa supervivencia y ausencia de p16. Como parte del ciclo celular, la expresión de ciclina D1 no ha sido detectada. (1)

ESTRATEGIAS PARA TRATAMIENTO BASADAS EN ANTICUERPOS ESPECIFICOS:

Se ha considerado como potencial factor pronóstico y con probable finalidad terapéutica la expresión de HER2 (*c-erbB2*). El HER2 o *c-erbB-2* es un protooncogen localizado en el cromosoma 17q21 que tiene una glicoproteína transmembrana con actividad de tirosina cinasa que muestra similitud estructural al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico. Así, el factor de diferenciación *neu*, o heregulin estimula la actividad de cinasa de ErbB-2. (12) NDF no interactúa de manera directa con ErbB-2 más que con un heterodimero de ErbB-2 y el

receptor relacionado tales como ErbB-3 o ErbB4. El ligando auténtico de ErbB-2 aún es desconocido. En ratas el oncogen *neu* es activado por una mutación aislada puntual: valina a ácido glutámico, glutamina o aspartato en la región transmembrana. La sobreexpresión en humanos de *c-erbB-2* induce transformación maligna de fibroblastos de roedores. (9, 11,13)

La sobreexpresión del oncogen *Her-2/neu* ha sido evaluada y tiene significado pronóstico en cáncer de mama, se ha identificado expresión de 15 a 40% de estos casos y se asocia a sobrevida global corta. En hueso normal, la sobreexpresión de HER2 es escasa.

En 1996 Onda y colaboradores, (5) así como Gorlick en 1999(13,14) informaron que la sobreexpresión de *Her2/neu* en osteosarcomas se relaciona con metástasis pulmonares tempranas y sobrevida limitada, por lo cuál se sugirió que *Her2/neu* podría considerarse como un factor pronóstico desfavorable asociado a metástasis. En otros estudios, se han identificado problemas en la evaluación de este oncogen. Kilpatrick y colaboradores en una serie de 41 pacientes informaron la sobreexpresión de *Her2/neu* citoplásmica focal en un 40 a 98% con intensidades variables. La positividad citoplásmica no correlacionó con el grado o subtipo histológico, el grado de respuesta a quimioterapia, metástasis o sobrevida de los pacientes.

Por otro lado, en la serie de Akatsuka, (15) en pacientes con osteosarcomas de alto grado sin enfermedad metastásica al momento de diagnóstico y tratados con cirugía y quimioterapia neoadyuvante, la sobreexpresión de *Her2/neu* en células neoplásicas se asoció con un incremento en la probabilidad de sobrevida libre de enfermedad, en este estudio, no se

consideró la localización de la tinción (membrana o citoplásmica) ni la intensidad de la misma. A la fecha, los resultados siguen siendo controversiales, como el de Ferrari publicado en 2004, la sobreexpresión de HER2/neu en la membrana celular se asoció a la presencia de múltiples metástasis e intervalos cortos de sobrevida libre de enfermedad. (12, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23)

JUSTIFICACIÓN

El osteosarcoma constituye la principal neoplasia ósea maligna en niños, seguido del Sarcoma de Ewing. Aunque la supervivencia global de los pacientes con osteosarcoma se ha incrementado en las últimas décadas, la enfermedad recurrente y metastásica del osteosarcoma son los principales factores involucrados en la mortalidad de los niños. A pesar de que se utilizan factores pronósticos clínicos, de laboratorio e histológicos, en ocasiones, éstos no son suficientes para predecir el comportamiento biológico de estas neoplasias. Se han estudiado algunas alteraciones genéticas, sin embargo, aún no se ha identificado correlación entre éstos y el pronóstico de pacientes pediátricos con osteosarcoma.

OBJETIVO

Analizar la expresión de factores de proliferación, proteínas reguladoras del ciclo celular y protooncogenes, mediante inmunohistoquímica, en tejido fijado en formaldehído y embebido en parafina en osteosarcomas en niños.

HIPÓTESIS

Los factores de proliferación celular, proteínas reguladoras del ciclo celular y protooncogenes se encuentran sobreexpresados en pacientes con osteosarcoma.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio observacional, retrospectivo, comparativo, transversal.

UBICACIÓN DEL ESTUDIO:

Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría.

POBLACIÓN ELEGIBLE

Pacientes con biopsia con diagnóstico histopatológico de osteosarcoma primario atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría de 1990-2004.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes de cualquier género, menores de 18 años.
2. Pacientes con diagnóstico de osteosarcoma sin tratamiento previo.
3. Pacientes con osteosarcoma que cuenten con laminillas y bloques de parafina disponibles.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes con diagnóstico de osteosarcoma en los que el material sea inadecuado para inmunohistoquímica.

VARIABLES DEL ESTUDIO

VARIABLES INDEPENDIENTES:

1. Expresión de Ki-67, p53, c-erbB-2, bcl-2, Ciclina D-1.
2. Edad
3. Género
4. Variedad histológica

VARIABLES DEPENDIENTES:

1. Intensidad de la positividad
2. Porcentaje de positividad
3. Presencia de metástasis

HOJA DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Anexo 1 y 2.

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Del archivo de patología quirúrgica se obtuvieron todos los casos con diagnóstico de osteosarcoma entre 1990 y 2004. Todos los casos fueron teñidos con hematoxilina y eosina, fueron evaluados, se corroboró el diagnóstico histopatológico y se seleccionaron las laminillas para inmunohistoquímica.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizaron cortes a 2 micras del tejido seccionado y se montaron en laminillas previamente tratadas con una solución de poli-L-lisina. Se realizó la técnica de inmunohistoquímica con el complejo biotina-estreptavidina/peroxidasa

mediante el sistema de detección LSAB+/HRP (Labelled streptavidin-biotin, Dako Corporation, Carpintería Calif. USA).

Para el desenmascaramiento de epítopes se utilizó citrato de sodio al 0.1M pH 6.2 y EDTA 0.1M pH 9, durante 5 minutos en la olla de presión/horno de microondas y se enfriaron a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente las muestras fueron tratadas con peróxido de hidrógeno al 0.9% en medio acuoso e incubadas con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS por cinco minutos cada uno, los anticuerpos ki-67 (Clona MIB-1, cat M7240), pRB110 (Clona Rb1, cat m7131), p53 (Clona DO-7, cat M7001), c-erBb-2 (policlonal), ciclina D-1 (Clona DCS-6, cat M3571) protooncogen bcl-2 (Clona 124, cat M0887) todos de la marca Dako Cymation, Carpintería Calif. USA, se incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario biotinilado y el complejo estreptavidina/peroxidasa se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Para la visualización de la reacción se utilizó como sustrato 3,3'-deaminobencidina-H₂O₂ y la reacción se monitoreo al microscopio. Se deshidrataron las laminillas en un tren de tinción con alcohol etílico degradado al 50%, 60%, 70%, 96%, alcohol absoluto, se contrastaron con hematoxilina de Gill por 3 minutos y finalmente se les colocó el cubreobjeto con resina sintética Entellan.

En cada laminilla de casos problema, se incluyeron como control positivo para cada anticuerpo, tejidos que previamente se habían probado y que se utilizan de control rutinario para dichos marcadores. En todos los casos se realizó vimentina (marcador genérico) para verificar la viabilidad y antigenicidad del tejido estudiado. Además, en cada corrida de inmunohistoquímica se incluyeron cortes del tejido a analizar (osteosarcomas) los cuales fueron sometidos al mismo

procedimiento pero sin el anticuerpo primario, estos tejidos sirvieron como controles negativos.

EVALUACIÓN

Se analizó la positividad para cada uno de los marcadores ya comentados, en base a criterios preestablecidos (véase anexo 1), para lo cual, en el caso de marcadores nucleares se analizó el porcentaje de núcleos positivos en 600 células neoplásicas, se utilizó un analizador de imágenes (Image Pro Plus) en un microscopio Olympus. Se diseñó un programa especial que permitió la estandarización de la positividad en la expresión de inmunohistoquímica con la adecuada calibración de la intensidad de tinción a un tono específico. Los marcadores de membrana fueron evaluados por dos patólogos que utilizaron un microscopio de luz Olympus. Los resultados fueron expresados en escalas semicuantitativas y cuantitativas. La positividad para Ki-67, pRb, p53 y ciclina D1 fue evaluada: 0 (sin tinción), 1 (tinción positiva en 1-25% de células neoplásicas), 2 (tinción en 26-50% de células neoplásicas), 3 (tinción en 51-75% de células neoplásicas) y 4 (tinción positiva en 76-100% de células neoplásicas); mediciones de ≥ 2 fueron considerados positivos. Para bcl-2 se consideró positivo a partir de 2%. La positividad para HER2 se evaluó en la membrana celular (anexo 1).

ANALISIS ESTADISTICO

Las variables demográficas se analizarán con medidas de tendencia central. Las variables ordinales se analizaron con χ^2 .

RESULTADOS

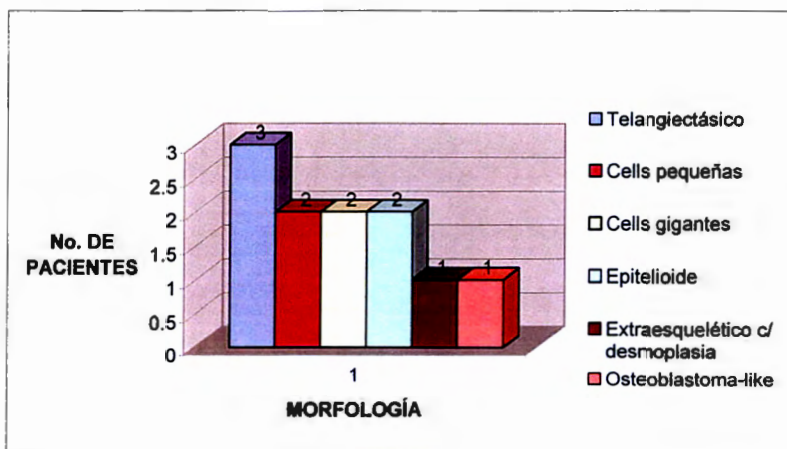
En el estudio se incluyeron 69 pacientes con diagnóstico de osteosarcoma en 34 hombres y 35 mujeres con edad mediana de 12 años. La localización más frecuente fue en huesos largos, 33 casos estuvieron localizados en fémur, 15 en tibia y 11 en húmero. En 10 casos el tumor se encontró en sitios poco convencionales. Se identificaron 30 pacientes con metástasis al momento del diagnóstico. Los sitios más frecuentes de metástasis fueron pulmón y hueso en 24 y 4 pacientes, respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características clinicopatológicas de osteosarcomas en niños.

Variable	No. De pacientes n=69
Edad (mediana)	12 años
Género	
Hombres	34
Mujeres	35
Localización	
Fémur	33
Tibia	15
Húmero	11
Otro	10
Parrilla costal	
Cráneo	
Esternón	
Pelvis	
Rótula	
Metástasis	30
Pulmón	24
Hueso	4
Otros	2

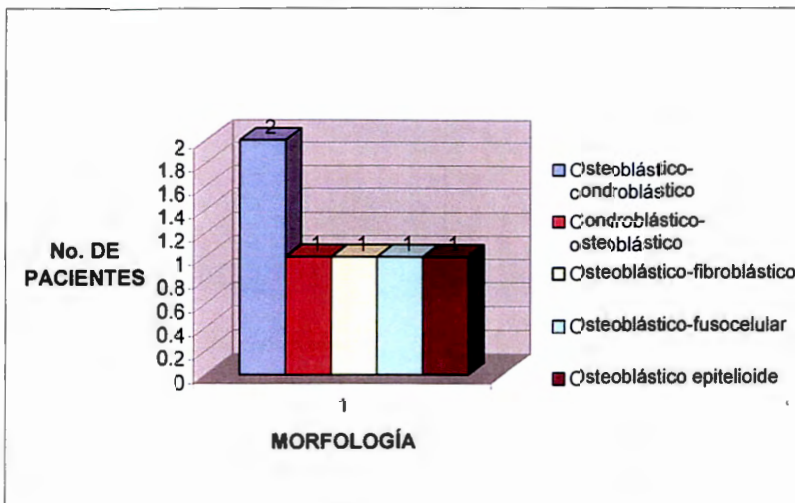
Morfológicamente se identificaron 42 pacientes con osteosarcoma osteoblástico, 9 con condroblástico, 1 fibroblástico y 11 con morfología poco usual (Figura 1).

Figura 1. Frecuencia de osteosarcomas con morfología poco usual.



En 6 pacientes la biopsia inicial mostró morfología combinada. En ellos se observó componente osteoblástico que alternaba con otro patrón histológico, principalmente condroblástico (Figura 2). Cinco pacientes con esta morfología presentaron metástasis al momento del diagnóstico.

Figura 2. Osteosarcomas con morfología combinada en niños.



EXPRESIÓN DE FACTORES DE PROLIFERACIÓN Y PROTEÍNAS DEL CICLO CELULAR

Se identificó positividad inmunohistoquímica para bcl-2, Ki-67, pRb y ciclina D-1 en 81.4, 48.6, 43, y 40% respectivamente, mientras que la expresión de p53 fue menor al 25% (Cuadro 2).

Cuadro 2. Expresión de factores de proliferación y proteínas del ciclo celular en osteosarcomas en niños.

p

Anticuerpo	No. de casos	%
Ki-67	34/67	48.6
bcl-2	57/67	81.4
pRb	28/67	40.0
p53	16/65	23.0
Ciclina D-1	30/58	43.0

De los casos positivos para Ki-67 (34 pacientes) 11 presentaron metástasis al momento de diagnóstico ($p=0.06$). Aunque la correlación no es estadísticamente significativa, el número de casos con metástasis y positivo a Ki-67 muestra una tendencia para considerarlo como un factor pronóstico. En 23 se identificó positividad para bcl-2 y enfermedad metastásica ($p=NS$). El resto de los marcadores no mostraron correlación con metástasis (Cuadro 3).

Cuadro 3. Correlación entre la expresión de factores de proliferación y proteínas del ciclo celular y metástasis en osteosarcomas en niños.

Anticuerpo	No. de casos*	Valor p^*
Ki-67	11	0.06
bcl-2	23	.247
pRb	10	.393
p53	5	.336
Ciclina D-1	11	.457

* Casos positivos para cada anticuerpo y metástasis

* χ^2

Por medio de inmunohistoquímica se identificó positividad de membrana leve e incompleta (1+) para HER2 en 3 casos. En 11 y 2 pacientes se observó reactividad citoplásmica y nuclear, respectivamente; sin embargo, estos casos fueron considerados negativos (Anexo 1: escala de evaluación de HER2/c-erbB-2)

Al analizar por separado el grupo de osteosarcomas osteoblásticos (n=42), la expresión de los marcadores fue similar al grupo en su totalidad (n=69). Se identificó sobreexpresión de Ki-67, bcl-2, pRb y ciclina D1 en más del 30% de los pacientes. La positividad para p53 fue baja (Cuadro 4).

Cuadro 4. Expresión de factores de proliferación y proteínas del ciclo celular en osteosarcomas osteoblásticos en niños.

Anticuerpo	No. de casos	%
Ki-67	19/41	46.2
bcl-2	34/40	85.0
pRb	18/41	43.9
p53	7/39	17.9
Ciclina D-1	19/35	54.3

Se identificaron 19/42 pacientes con metástasis. La expresión de los marcadores fue similar al grupo total y no se documentó una correlación importante entre metástasis y expresión de los mismos.

DISCUSIÓN

En el INP se encontró una frecuencia igual de presentación en hombres y mujeres, con una relación 1:0.9, a diferencia de lo que se describe en la literatura (una relación H:M de 3:1), con una mediana de 12 años al momento de diagnóstico. (1, 2, 3,4).

A diferencia de lo descrito en la literatura se encontró casi el doble de pacientes con metástasis al momento de diagnóstico (43.5% vs. 15 a 20%). (20)

Los osteosarcomas expresan en el 29% pérdida de la expresión de pRb, y 16% pérdida de la expresión de p16. Nosotros investigamos únicamente la expresión de pRb ya que en su estado activo actúa como regulador negativo de la célula de la fase S a la fase G1, observando que es discretamente mayor en pacientes sin metástasis que en pacientes con metástasis. La Ciclina D-1 mostró una elevada expresión en proporción directa con la expresión de pRb, siendo esto comprensible, por su íntima relación en el ciclo celular, activando la transcripción de varios genes cuyos productos son básicos para la progresión hacia la fase S. (23)

En este estudio, la expresión de bcl-2 mostró relación casi proporcional a la expresión de Ki-67, lo cuál es lógico por la relación que guardan en el ciclo celular.

Nosotros encontramos una expresión de p53 del 23%, sin encontrar relación significativa con otros parámetros clínicos. En relación a los niños con metástasis, solo el 25.9% mostró expresión de p53. Esto se encuentra en correlación con los hallazgos informados por varios autores quienes consideran que la pérdida de la función de p53 es importante para algunos osteosarcomas

esporádicos. Se han informado mutaciones en p53 hasta en el 22% de los osteosarcomas, sin relación a recurrencia de enfermedad en sitios distantes y sin significado estadístico en los análisis multivariados, similar a nuestros hallazgos. (24, 25,26)

Llama la atención que en nuestra población pediátrica encontramos que a partir de los 8.3 años existió un incremento en la expresión de p53 proporcional a la edad. Algunos estudios han mostrado que la sobreexpresión de p53 no se relaciona con un alto índice de proliferación, sin embargo, si se ha asociado a la edad de los pacientes. Esto es importante, ya que en la edad pediátrica, la expresión de p53 es negativa, por el contrario, en adultos, es positiva con $p < 0.04$. (26,27).

En relación a la expresión de HER2, nosotros obtuvimos tinción incompleta de membrana celular en 3 casos en $< 20\%$ de células neoplásicas. Estos resultados, según la literatura, son considerados negativos. Así mismo, Anninga y colaboradores, informaron positividad de membrana en 1 de 27 casos el cual no mostró amplificación con FISH. Este investigador concluye que la expresión de HER-2 no tiene un rol importante como factor pronóstico en osteosarcomas. (28, 29,30)

Esto nos lleva considerar, que la expresión de c-erbB-2 no es un factor pronóstico aislado en la biología tumoral de los osteosarcomas, así como a considerar que el anticuerpo monoclonal trastuzumab dirigido contra el receptor de HER2, no es una terapéutica efectiva contra los osteosarcomas y que hay que considerar que es una neoplasia multifactorial y dinámica, en la que hay que investigar otros factores que ayuden a una nueva terapéutica en osteosarcomas.

Es necesario contar con técnicas de biología molecular más sensibles y específicas para detectar mutaciones en éstas moléculas, para evaluar su significado biológico real en relación a la sobrevida de los pacientes.

CONCLUSIONES

1. En esta serie, la localización más frecuente de osteosarcomas fue en el tercio distal de fémur(47.8%) y el osteosarcoma osteoblástico(60.8%) el subtipo histológico más común.
2. La frecuencia de metástasis al momento del diagnóstico es elevada (30 pacientes, 43.5%) y común en pacientes con morfología combinada.
3. La expresión de Ki-67, bcl-2, pRb y ciclina D1 es frecuente en osteosarcomas en niños. Sin embargo, no se observó correlación con enfermedad metastásica.
4. No encontramos sobreexpresión de HER2 en osteosarcomas en nuestra serie.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Marina N, Gebhardt M, Teost L, Gorlick R. Biology and therapeutic advances for Pediatric Osteosarcoma. *The Oncologist*, 2004; 9:422-441.
- 2.-Ruano AJ, Calderón EC, Martínez AA. Osteosarcoma. *Oncología Médico Quirúrgica Pediátrica*. 1ª ed. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., 2001; 28:292-307.
- 3.-Dorfman DH, Czerniak B. Bone tumors. Osteosarcoma. Mosby, 1998:128-252.
- 4.-Onda M. Matsuda S, Higaki S, Iijama T, Fukushima JI, Yokokura A, Kojima T, Horiuchi H, Kurokawa T, Yamamoto T. ErbB-2 Expression is correlated with poor prognosis for patients with osteosarcoma. *Cancer* 1996; 77:71-8.
- 5.-Hasegawa T, Hirose T, Kudo E, Hizawa K, Usui M, Ishii S. Immunophenotypic heterogeneity in osteosarcomas. *Hum Pathol* 1991; 22:583-590.
- 6.-Vigorita Vincent J. Orthopedic Pathology. Bone tumors. Osteosarcoma. Lippicott Williams & Wilkins, 1999: 326-346.
- 7.-Nakajima H, Sim FH, Bond JR, Unni KK. Small cell osteosarcoma of bone. *Cancer* 1997; 79:2095-106.
- 8.-Cappana R, Bertoni F, Bacchini P, Bacci G, Guerra A, Campanacci M. Malignant fibrous histiocytoma of bone. The experience at the Rizzoli Institute: report of 90 cases. *Cancer* 1984; 54:177-187.
- 9.-Thomas DG, Giordano TJ, Sanders D, Biermann S, Baker L. Absence of Her2/neu Gene expression in osteosarcoma and Skeletal Ewing's sarcoma. *Clinical Cancer Research* 2002; 8:788-793.

- 10.-Saeter G, Elomaa I, Wahlqvist Y, Alvergard TA, Wiebe T, Monge O, Forrestier E, Solheim OP, Prognostic factors in bone sarcomas. *Acta Orthop Scand Suppl* 1997; 273:156-60.
- 11.-Ferrari S, Bertoni F, Zanella L, Setola E, Bacchini P, Alberghini M, Versari M, Bacci G. Evaluation of Glycoprotein P, HER-2-ErbB-2, p53 y bcl-2 in primary tumor and metachronous lung metastases in patients with high-grade osteosarcoma. *Cancer* 2004; 1:1936-42.
- 12.-Gorlick R, Huvos AG, Heller G, Aledo A, Beardsley GP, Healey JH, Meyers PA. Expression of HER2/erbB-2 correlates with survival in osteosarcoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:2781-88.
- 13.-Gokcoz N, Wunder IS, Mousses S, Eskandarian S, Bell RS, Andrulis H. Comparison of p53 mutations in patients with localized osteosarcoma and metastatic osteosarcoma. *Cancer* 2001; 92:2181-2189.
- 14.-Maitra A, Roberts H, Weinberg AG, Geradts J. Loss of p16 (INK4a) expression correlates with decreased survival in pediatric osteosarcomas. *Int J Cancer* 2001; 95(1):34-38.
- 15.- Akatsuka T, Wada T, Kokai Y, Kawaguchi S, Isu K, Yamashiro K, Yamashita T, Sawada N, Yamawaki S, Ishii S. ErbB2 Expression is correlated with increased survival of patients with osteosarcoma. *Cancer* 2002; 94:1397-404.
- 16.-Lonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M. P53 and MDM2 Alterations in osteosarcomas. Correlation with clinicopathologic features and proliferate rate. *Cancer* 1997; 79:1541-7.

- 17.-Zhou H, Randall RL, Brothman AR, Maxwell T, Coffin CM, Goldsby RE. Her-2/neu expression in osteosarcoma increases risk of lung metastasis and can be associated with gene amplification. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25:27-32.
- 18.-Kilpatrick SE, Geisinger KR, King TS, Sciarrota J, Ward WG, Gold SH, Bos GD. Clinicopathologic analysis of Her-2/neu immunoexpression among various histologic subtypes and grades of osteosarcoma. *Mod Pathol* 2001;14:1277-83.
- 19.-Ferrari S, Bertoni F, Mercury M, Picci P, Giacomini S, Longhi A, Bacci G. Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: an analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute. *Ann Oncol* 2001; 12:1145-50.
- 20.-Link MP, Eilber F. Pediatric oncology. Osteosarcoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, eds. Principles and practice of pediatric oncology. Philadelphia. Lippincott, 1989; 689-711.
21. - Cotran R, Kumar V, Collins T. Neoplasm. In: Robbins Structural and functional pathology. McGraw-Hill Interamericana, 2005.
22. - Scholz RB, Kabish H, Weber B, Roser K, Delling G, Winkler K. Studies of the RB1 gene and the p53 gene in human osteosarcomas. *Pediatr Hematol Oncol* 1992; 9:125-37.
23. - Nielsen GP, Burns KL, Rosenberg AE, Louis DN. CDKN2A gene deletions and loss of p16 expression occur in osteosarcomas that lack RB alterations. *Am J Pathol* 1998; 153:159-63.
24. - Patino-Garcia A, Pineiro ES, Diez MZ, Iturriagaitia LG, Klusmann FA, Ariznabarreta LS. Genetic and epigenetic alterations of the cell cycle regulators

and tumor suppressor genes in pediatric osteosarcomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25:362-7.

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

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

27.- Gorlick R, Anderson P, Andrulis I, Arndt C, Beardsley P et al. Biology of childhood osteogenic sarcoma and potential targets for therapeutic development. *Clin Can Res* 2003; 9:5442-5453.

28.-Anninga JK, Van de Vijver MJ, Cleton-Jansen AM, Kristel PM, Taminiau AH, Nooij M, Egeler RM, Hogenddiirn PC. Overexpression of the HER-2 oncogene does not play a role in high-grade osteosarcomas. *Eur J Cancer* 2004; 40:963-70.

29.-Scotlandi K, Manara MC, Hattinger CM, Benini S, Perdichizzi S, Pasello M, Bacci G, Zanella L, Bertoni F, Picci P, Serra M. *Eur J Cancer* 2005; 41:1349-61.

30.-Tsai JY, Aviv H, Benevenia J, Chang VT, Patterson F, Aisner S, Hameed M. HER-2/neu and p53 in osteosarcoma: an immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization analysis. *Cancer Invest* 2004; 22:16-24.

ANEXO 1

ESCALA DE EVALUACIÓN DE HER2/erbB2***

GUIA DE EVALUACION DE HercepTest

CALIFICACION	EVALUACION DE LA EXPRESION DE HER2	PATRON DE TINCION
0	Negativo	Sin tinción, tinción de membrana en <10% de células neoplásicas
1+	Negativo	Tinción débil de membrana en >10% de las células neoplásicas. Las células solo se tiñen en una parte de la membrana
2+	Positivo	Tinción débil a moderada de membrana completa en >10% de las células neoplásicas
3+	Positivo	Tinción fuerte de membrana completa en >10% de las células neoplásicas

Biopharmaceutical Services, Impath Laboratorios, Froylan Espinoza M.D.
Molecular Tissue Pathology, Qeso Diagnostics/Nichols Institute and Dako.

ESCALA DE EVALUACION DE p53, Ki-67 y bcl-2

En la evaluación de p53, Ki-67, ciclina D-1, pRB y bcl-2 la positividad será considerada en el núcleo, con la siguiente escala semicuantitativa:

0	Negativo, sin tinción
1+	1% a 25% de las células tienen tinción positiva
2+	26% a 50% de las células neoplásicas tienen tinción positiva
3+	51% a 75% de las células neoplásicas tienen tinción positiva
4+	76% a 100% de las células neoplásicas tienen tinción positiva

Cancer 2004; 100:1936-42. Ferrari S, Bertoni F ET all.

ANEXO 2

HOJA DE RECOLECCION DE DATOS

1.-NOMBRE: REGISTRO

2.-EDAD:

3.-SEXO:

0 Masculino

1 Femenino

4.-SITIO DE PRESENTACION DEL TUMOR

0 FEMUR

1 TIBIA

2 HUMERO

3 OTRO

4 MULTICENTRICO

5.-No. DE BIOPSIA INICIAL:

BIOPSIA SUBSECUENTE:

RESECCION POSTQUIMIOTERAPIA 0 1

METASTASIS

6.-VARIEDAD HISTOLOGICA:

OSTEOBLASTICO 0

CONDROBLASTICO 1

FIBROBLASTICO 2

OTRO 3

7.- EVALUACION DE INMUNOHISTOQUIMICA

MARCADOR			%
Ki-67	1	0	
p53	1	0	
pRb	1	0	
c-erbB-2	1	0	
bcl-2	1	0	
Ciclina D-1	1	0	