
JUAN PABLO ZUMARRAGA MONTAÑO

Correlação entre os valores séricos de fosfatase alcalina e de desidrogenase láctica e a porcentagem de necrose tumoral pós-quimioterapia no osteossarcoma

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Ortopedia e Traumatologia
Orientador: Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo

SÃO PAULO
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autoriza

Zumarraga Montaña, Juan Pablo

Correlação entre os valores séricos de fosfatase alcalina e de desidrogenase láctica e a porcentagem de necrose tumoral pós quimioterapia no osteossarcoma / Juan Pablo Zumarraga Montaña. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Olavo Pires de Camargo.

Descritores: 1.Osteosarcoma 2.Fosfatase alcalina 3.L-lactato desidrogenase
4.Fatores de necrose tumoral 5.Quimioterapia 6.Prognóstico

USP/FM/DBD-036/14

Ah!

Meu Senhor e Deus!

Eis que tu fizeste os céus e a terra com o teu grande poder e com teu braço estendido,
não te é maravilhosa demais alguma coisa.

Tu usas de benignidade com milhares e tornas a maldade dos pais ao seio dos filhos
depois deles, tu és o grande e poderoso Deus cujo nome é SENHOR dos Exércitos,
grande em conselho e magnífico em obras, porque os teus olhos estão abertos sobre
todos os caminhos dos filhos dos homens, para dar a cada um segundo os seus
caminhos e segundo o fruto das suas obras.

Tu puseste sinais e maravilhas na terra do Egito até o dia de hoje, tanto em Israel
como entre os outros homens, e te criaste um nome, qual é o que tens neste dia.

(Jeremias 32, 17-20)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Juan Diego e Maria Aparecida, pelo amor incondicional e por guiar meu caminho na verdade divina de Deus.

À minha mulher, Ana Sofia, pela inspiração diária e por fazer de mim um homem melhor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo, pelo estímulo ao aprendizado contínuo e pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao Dr. André Mathias Baptista, pela sua orientação permanente, as oportunidades e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr. Marcelo Tadeu Caiero, pelo apoio, incentivo e amizade, por ser um exemplo para a minha vida.

Aos Drs. Luiz Filipe Marques Correia e Daniel Cesar Seguel Rebolledo, pela amizade e ensinamentos contínuos.

Às secretarias Rosana Moreno Costa e Tânia Maria Borges, pelo auxílio e participação no processo e na realização deste trabalho.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

	Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
	Lista de quadros e figuras	
	Lista de tabelas e gráficos	
	Resumo	
	Summary	
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	5
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3.1	Osteossarcoma.....	8
3.2	Exames laboratoriais.....	12
3.2.1	Desidrogenase lática.....	13
3.2.2	Fosfatase alcalina.....	14
3.3	Necrose tumoral pós-quimioterapia.....	15
3.4	Prognóstico nos doentes com osteossarcoma.....	18
4	MÉTODOS.....	22
4.1	Ética.....	23
4.2	Amostra.....	23
4.3	Crítérios de inclusão.....	24
4.4	Crítérios de exclusão.....	24
4.5	Casuísta.....	24
4.6	Método.....	26
4.7	Análise estatística.....	27
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Avaliação dos valores de fosfatase alcalina e desidrogenase lática com a porcentagem de necrose tumoral.....	30
5.2	Alterações dos valores iniciais da medição de fosfatase alcalina e desidrogenase lática após a quimioterapia pré-operatória.....	31
6	DISCUSSÃO.....	36
7	CONCLUSÃO.....	46

8	ANEXOS.....	48
9	REFERÊNCIAS.....	54

ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

<	Menor que
=	Igual a
>	Maior que
%	Porcentagem
CTx	Telopectídeo C-terminal
DHL	Desidrogenase láctica
DP	Desvio padrão
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
FA	Fosfatase alcalina
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
NT	Necrose tumoral
OC	Osteocalcina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Osteossarcoma
Prof.	Professor
QT	Quimioterapia
RM	Ressonância magnética
TC	Tomografia computadorizada axial

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

QUADROS

Quadro 1	Resposta do tumor a quimioterapia (Índice de Huvos).....	17
----------	--	----

FIGURAS

Figura 1	Osteossarcoma de tipo telangectásico (200 X-HE).....	9
Figura 2	Classificação dos osteossarcomas de acordo com a Organização Mundial da Saúde da classificação de tumores.....	10
Figura 3	Estrutura molecular da desidrogenase láctica.....	13
Figura 4	Estrutura molecular da fosfatase alcalina.....	14
Figura 5	Preparação de uma peça cirúrgica com sua radiografia para análise anatomopatológica utilizando o método de Huvos.....	16
Figura 6	Fotomicrografia mostrando necrose tumoral pós-quimioterapia segundo o Índice de Huvos.....	17

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

TABELAS

Tabela 1	Descrição das características dos pacientes e da doença.....	21
Tabela 2	Descrição das enzimas, suas variações com a quimioterapia e a porcentagem de necrose tumoral da peça cirúrgica.....	25
Tabela 3	Resultado das correlações do índice de Huvos com os valores da DHL e FA, e entre as enzimas em cada momento da avaliação e suas variações após quimioterapia.....	26

GRÁFICOS

Gráfico 1	Diagrama de dispersão entre FA pré e FA pós-quimioterapia.....	27
Gráfico 2	Diagrama de dispersão entre DHL pré e DHL pós-quimioterapia..	27
Gráfico 3	Diagrama de dispersão entre DHL pré e FA pré-quimioterapia.....	28
Gráfico 4	Diagrama de dispersão entre DHL pós e FA pós-quimioterapia....	28
Gráfico 5	Diagrama de dispersão entre Huvos e FA pré e pós-quimioterapia	29
Gráfico 6	Diagrama de dispersão entre Huvos e DHL pré e pós quimioterapia.....	29

RESUMO

Montaño JPZ. *Correlação entre os valores séricos de fosfatase alcalina e de desidrogenase láctica e a porcentagem de necrose tumoral pós quimioterapia no osteossarcoma* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2014.

INTRODUÇÃO: A resposta do osteossarcoma (OS) à quimioterapia (QT) pré-operatória é atualmente o indicador mais sensível para o prognóstico de sobrevida dos pacientes diagnosticados com OS. Esta resposta é avaliada mediante a porcentagem de necrose encontrada pelo patologista após a extração da peça na cirurgia, utilizando-se o índice de necrose tumoral de *Huvos*, no qual a necrose é expressada percentualmente. Existem estudos correlacionando os valores da fosfatase alcalina (FA) e da desidrogenase láctica (DHL) com a sobrevida do paciente. Neste trabalho foi pesquisada a relação que existe entre os valores sanguíneos, pré e pós QT, de FA e DHL, com a porcentagem de necrose tumoral encontrada na peça cirúrgica após a realização da QT pré-operatória. **MÉTODOS:** Foram estudados 647 prontuários de pacientes tratados pelo Grupo de Oncologia Ortopédica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 1990 até o início de 2013, com diagnóstico anatomopatológico de OS. Destes, 510 foram excluídos por não apresentarem dados completos para a análise posterior. Foram incluídos um total de 137 prontuários. Os valores da FA e da DHL dos pacientes incluídos foram obtidos da realização do estadiamento, antes da QT pré-operatória e dos valores reportados após a finalização da QT pré-operatória. Também foi coletado o grau de necrose tumoral de cada peça extraída na cirurgia de cada paciente. Classificamos os resultados da FA e DHL obtidos em dois grupos. No grupo I os pacientes com valores normais de FA e DHL, no grupo II, os pacientes com valores acima do limite de normalidade. A classificação utilizada para agrupar os valores de sorológicos em investigação foi adaptado do trabalho realizado por Bramer et. al. Foi reportada a porcentagem de necrose tumoral descrita pelos patologistas, obtida das peças extraídas nas cirurgias realizadas pós QT. Esta porcentagem foi classificada de acordo com a classificação de *Huvos*. Foram calculadas as correlações da necrose da peça cirúrgica (*Huvos*) com as enzimas pré, pós e alteração (pós-pré) QT e também entre as enzimas, com uso de correlações de *Spearman* para verificar a existência de correlação entre elas. **RESULTADOS:** Tanto a FA como a DHL diminuíram nos pacientes estudados, quando comparados os valores pré QT e pós QT. A média da diferença da FA obtida pré QT e pós QT foi de 795,12 U/L sendo o valor pré QT maior ao valor pós QT. A diferença entre os valores da DHL pré QT e pós QT foi em média de 437,40 U/L, sendo o valor pré QT maior ao valor pós QT. Não houve correlação estatisticamente significativa entre o índice de *Huvos* e os valores de FA e DHL. A ausência da relação foi observada tanto com os valores pré-quimioterapia, quanto com os valores pós-quimioterapia, não obtendo correlação com a alteração das enzimas após a quimioterapia ($p < 0,05$). **CONCLUSÃO:** A medição de FA e da

DHL não são fatores preditivos sobre a resposta tumoral à quimioterapia pré-operatória em pacientes portadores de osteossarcoma.

DESCRITORES: Osteossarcoma; Fosfatase alcalina; L-lactato desidrogenase; Fatores de necrose tumoral; Quimioterapia; Prognóstico.

SUMMARY

Montaño JPZ. *Correlation between the serum values of alkaline phosphatase and lactate deshydrogenase and the chemotherapy-induced necrosis percentage in osteosarcoma* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2014.

BACKGROUND AND AIMS: The osteosarcoma's (OS) response to pre surgical chemotherapy (CT) is actually the most sensible predictor for life prognosis in patients diagnosed with OS. This response is evaluated by the chemotherapy-induced necrosis percentage found by the pathologist after the removal of the surgical piece, using the Huvos tumor necrosis (TN) index, in which the necrosis is expressed in percentage. There are studies that correlate the alkaline phosphatase (AP) and the lactate deshydrogenase (LDH) with the patient's life prognosis. In this study we researched the relationship between the serum levels of pre and post CT of AP and LDH and the percentage of TN found in the surgical piece after the pre surgical CT. **METHODS:** This is a retrospective study in which we studied 647 medical history files with anatomopathologic diagnosis of OS, treated by the Orthopedic oncology group of the Orthopedic and Traumatology Institute of the Hospital das Clinicas of the Medical School of the University of São Paulo between 1990 and 2013. Out of these, 510 were excluded for not having complete data for posterior analyses. We included 137 files in the study. The AP and the LDH values were obtained before and after pre surgical CT. We also obtained the degree of chemotherapy-induced TN obtained from the surgical piece. We classified the AP and the LDH into two groups. In the first group the patients with normal AP and LDH values and in the second group those with values above normal limit. This classification was adapted from the study published by Bramer et al. We classified the percentage of TN obtained from the removed surgical pieces after CT, using the Huvos index. We calculated the correlation between the TN with the pre, post and pre-post difference CT enzymes, using the Spearman correlation. **RESULTS:** The AP and the LDH decreased when comparing the pre CT values to the post CT values. The mean of the difference was of 795.12 U/L, the pre CT value being higher than the post CT. The difference between the LDH values pre and post CT was of 437.40 U/L, being the pre CT higher than the post CT. There was no statistically significant correlation between the Huvos index and the AP and LDH values. This was observed with the pre CT as well as with the post CT values ($p < 0,05$). **CONCLUSIONS:** The values of AP and LDH are not predictors for the tumor's chemotherapy-induced necrosis to pre surgical CT in patients with osteosarcoma.

DESCRIPTORS: Osteosarcoma; Alkaline Phosphatase; L-Lactate Dehydrogenase; Tumor Necrosis Factors; Drug Therapy; Prognosis.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OS) convencional, tumor primário no qual as células neoplásicas produzem tecido osteóide, é o tumor maligno primário não hematopoiético mais comum do osso. Tem uma incidência estimada de quatro a cinco para cada milhão de habitantes, sem apresentar uma associação importante com a etnia. Principalmente afeta jovens adultos de até 25 anos de idade e tem uma leve predisposição para o sexo masculino^{1, 2, 4, 5}.

A doença não tratada é inevitavelmente fatal. O crescimento local descontrolado e agressivo, em conjunto com a disseminação sanguínea rápida, indicam o curso da enfermidade. O lugar mais frequente de metástase é o pulmão, seguido pelo osso, o que se considera um evento avançado na história natural da doença^{47, 48}.

Até o final dos anos 70, na maioria dos serviços de oncologia ortopédica, os pacientes com diagnóstico de OS eram tratados unicamente com a amputação do membro acometido. Observou-se que aproximadamente 90% evoluíam para o óbito em 12 meses. Atualmente, o prognóstico dos pacientes com OS, principalmente nos indivíduos nos quais a doença ainda está localizada, apresenta melhora^{22 24}.

A partir dos anos 80, após estudos randomizados, observou-se que a associação de quimioterapia ao tratamento cirúrgico melhorava significativamente o prognóstico

destes pacientes, obtendo-se valores de 60 a 70% de índice de sobrevida em cinco anos nos casos de doença localizada^{45, 46}.

A identificação de fatores de prognóstico do OS tem sido objetivo de ampla investigação científica. Vários fatores foram identificados, e alguns deles foram incorporados na estratégia do tratamento. As variáveis tradicionalmente usadas são: idade, gênero, localização anatômica, tamanho do tumor e os valores laboratoriais da fosfatase alcalina (FA) e da desidrogenase láctica (DHL) que se encontram elevados em mais de 50% dos pacientes com este diagnóstico^{15, 20, 23}.

A resposta do tumor à quimioterapia pré-operatória é atualmente o indicador mais sensível para o prognóstico de sobrevida dos pacientes diagnosticados com OS. Esta resposta é avaliada mediante a porcentagem de necrose ou quantidade de células tumorais viáveis encontradas pelo patologista após a extração da peça na cirurgia. É utilizado o índice de necrose tumoral de Huvos, no qual a necrose é expressada percentualmente, e dividida em quatro grupos^{27, 29, 44}.

Nos grupos I e II, considera-se que o tumor teve uma má resposta a quimioterapia pré-operatória. Nos grupos III e IV, consideramos que existiu uma boa resposta ao tratamento.

Existem estudos correlacionando os valores da FA e da DHL (dos fatores prognósticos sorológicos) com a sobrevida do paciente. Porém, poucos trabalhos estão focados na medição destes fatores laboratoriais como prognóstico direto para a

porcentagem de necrose tumoral, após a realização de quimioterapia pré-operatória. Visando cobrir esta falta de informação na literatura, neste trabalho foi pesquisada a relação entre os valores sanguíneos, pré e pós-quimioterapia, de fosfatase alcalina e desidrogenase láctica, com a porcentagem de necrose tumoral encontrada na peça cirúrgica após a realização da quimioterapia pré-operatória.

2. *OBJETIVO*

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar a relação entre os valores séricos de FA e DHL e a porcentagem de necrose tumoral pós-quimioterapia presente na peça cirúrgica.

3. *REVISÃO DA LITERATURA*

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Osteossarcoma

O osteossarcoma é definido pela presença de células mesenquimais malignas produtoras de tecido osteóide. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o osteossarcoma como “*tumor maligno primário intramedular de alto grau no qual as células neoplásicas produzem osteóide mesmo que em pequenas quantidades*”¹⁻³.

O osteossarcoma é um tumor formador de osso no qual os padrões histológicos predominantes são: clássico de alto grau, justacortical e periosteal de superfície¹⁻⁴.

Ocorre caracteristicamente em adolescentes e adultos jovens, na segunda década de vida. Tem predileção pelo sexo masculino e acredita-se que tal ocorrência seja devido aos homens apresentarem maior tempo de crescimento e maior estatura⁴⁻⁵.

Atualmente o OS representa 20% dos sarcomas, e é considerado o tumor maligno primário do osso mais comum, sem associação significativa com etnia ou raça. Há diversas predisposições genéticas, como o retinoblastoma hereditário, a síndrome de Li Fraumeni e a síndrome de Rothmund-Thomson¹⁻⁵.

O osteossarcoma é um tumor que pode acometer qualquer osso do corpo, preferencialmente afetando a região metafisária dos ossos longos. Estatisticamente, os Osteossarcomas acometem as metáfises dos ossos longos em 91% dos casos, e o restante ocorre nos ossos chatos ou nas epífises. Entretanto, no Brasil, há dificuldade em se obter um registro fidedigno da ocorrência de casos de OS²⁻⁶.

A OMS classifica os osteossarcomas em primários ou secundários (Figura 1). Os primários estão divididos em osteossarcoma clássico, osteossarcoma telangiectásico, osteossarcoma de células pequenas, osteossarcoma central de baixo grau, osteossarcoma parostal, osteossarcoma periosteal e osteossarcoma superficial de alto grau.

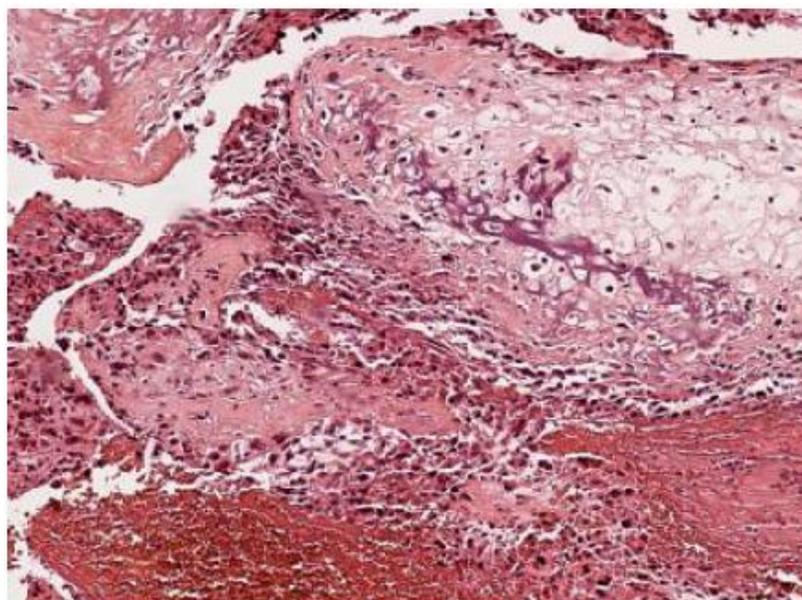


Figura 1. Osteossarcoma de tipo telangiectásico (200 X-HE)

Fonte: Bispo Júnior, 2009⁵¹

O osteossarcoma primário clássico se encontra subdividido de acordo com o tipo de matriz óssea predominante encontrada na biópsia, sendo estes tipos o osteoblástico, condroblástico e fibroblástico. Existem outras formas de osteossarcomas pouco comuns, porém, por estes não terem propriedades específicas, são considerados só como formas ou subtipos destes três grupos mencionados. Alguns exemplos são o osteossarcoma semelhante ao osteoblastoma, o osteossarcoma rico em células gigantes e o osteossarcoma de células claras⁴⁻¹⁰.

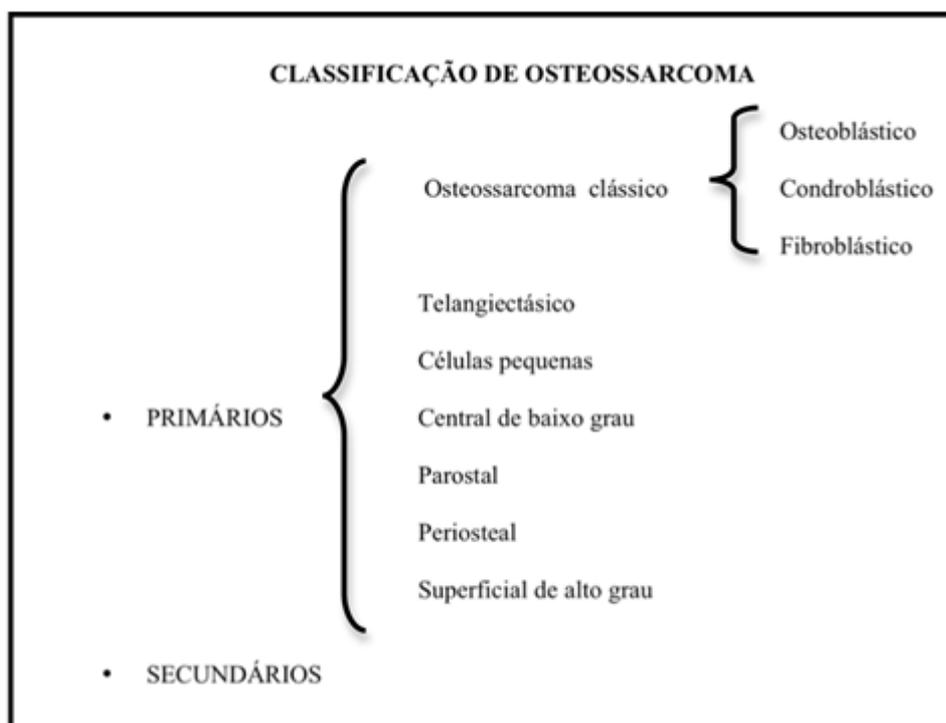


Figura 2. Classificação dos osteossarcomas de acordo com a Organização Mundial da Saúde da Classificação de Tumores

Fonte: Raymond et al., 2002¹

Não existem sinais ou sintomas específicos para o diagnóstico de OS. Em muitos casos, o paciente refere ter sofrido algum episódio traumático, e o sintoma mais comum é a dor. O crescimento tumoral palpável, com aumento de calor local, alterações cutâneas, limitação da função do membro afetado e diminuição da amplitude de movimento articular também podem estar presentes³⁻⁵.

Para o estadiamento do OS são necessários exames de imagem, de laboratório e estudo anatomopatológico (realizado através da biópsia do osso). Inicialmente, se realizam as radiografias do osso acometido, nos quais se observa na maioria das vezes, imagens características de agressividade como raios de sol e triângulo de Codman, assim como produção de matriz óssea. A tomografia computadorizada (TC) ajuda na avaliação da destruição e da produção óssea. Nas cinturas escapular e pélvica, a TC é de grande utilidade já que nas radiografias simples ocorre muita sobreposição de imagens.

Outro método de vital importância é a ressonância magnética (RM), já que mediante este exame de imagem conseguimos uma avaliação real dos tecidos moles, estruturas neuro-vasculares e da placa de crescimento da epífise. É o exame mais importante para o planejamento cirúrgico, inclusive para a detecção de metástase saltitante (*skip metastasis*)^{5,8,12-14}.

Também são necessários os exames para a investigação de possíveis metástases. Especialmente à realização de TC de tórax, já que como mencionado anteriormente, o pulmão geralmente é o primeiro órgão a apresentar metástase.

A cintilografia óssea tem a função principal de descobrir outras áreas do esqueleto envolvidas. É um exame de diagnóstico realizado com bifosfonados marcados com tecnécio 99-m. O radioisótopo se incorpora ao osso em formação. Existe também uma elevada concentração do radioisótopo nos locais com vascularização aumentada na fase de fluxo.

Outro ponto importante a ser abordado refere-se à biópsia óssea que, com a colaboração dos patologistas, ajuda a concluir o diagnóstico. Neste tipo de tumor é realizada uma biópsia percutânea, extraindo assim uma quantidade suficiente de material que permita a observação da celularidade da lesão. É o último passo do estadiamento¹²⁻¹⁴.

O tratamento convencional do OS segue o seguinte plano: após o estadiamento, realiza-se a quimioterapia pré-operatória (neoadjuvante), para depois realizar a cirurgia definitiva, e finalmente concluir com quimioterapia pós-operatória²⁵⁻²⁸.

3.2 Exames laboratoriais

Na atualidade, os valores dos exames laboratoriais apresentam especificidade limitada para o diagnóstico do OS. Contudo, são importantes para o prognóstico do mesmo. As duas enzimas mais utilizadas no diagnóstico e seguimento do osteossarcoma são a desidrogenase láctica (DHL) e a fosfatase alcalina (FA)^{3,7,14-17}.

3.2.1 Desidrogenase láctica

A DHL é uma enzima presente em uma ampla variedade de organismos. Existem quatro classes distintas, sendo duas delas do citocromo C (enzimas dependentes, agindo em ambos D-lactato e L-lactato) e as outras duas são dependentes de enzimas as quais agem iguais às anteriores. As classes estudadas no ser humano são as enzimas dependentes. A DHL catalisa a conversão reversível do ácido láctico no músculo em ácido pirúvico, que finalmente é um passo essencial na produção de energia celular. Em estudos atuais, a dosagem de DHL representa um índice de avaliação importante na evolução do osteossarcoma. Os limites de normalidade de DHL oscilam entre 24 e 480U/L^{2,11,17-20}.

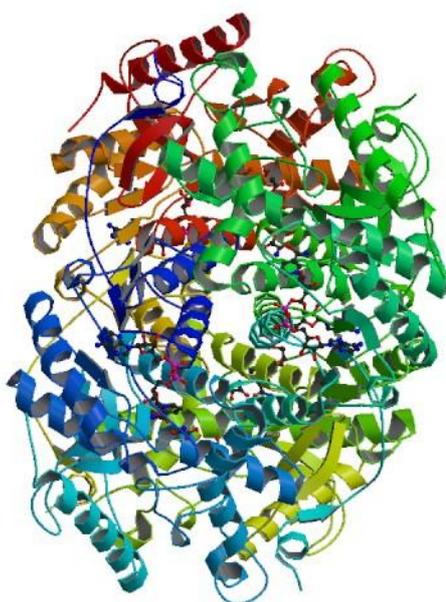


Figura 3. Estrutura molecular da desidrogenase láctica
Fonte: Read et al., 2001⁴⁹

3.2.2 Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (FA) é uma hidrolase que tem como função principal remover os grupos fosfato de um grande número de moléculas, incluindo os nucleotídeos, as proteínas e os alcalóides. Este processo é conhecido como desfosforilação. O valor de FA no osteossarcoma encontra-se elevado em aproximadamente 50% dos pacientes. Os estudos realizados por Thorpe et al. (1979)⁵² sugerem que a FA é um indicador de prognóstico do tumor, sendo este melhor nos pacientes com valores normais, semelhante ao que acontece com a DHL. Os limites de normalidade de FA são de 35 e 130U/L^{2,11,21-23}.

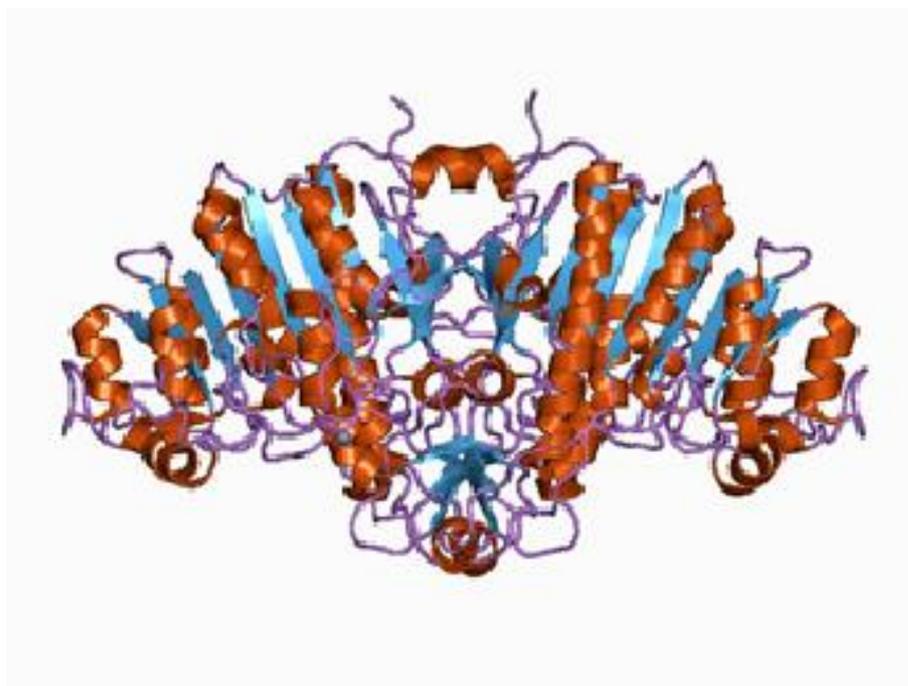


Figura 4. Estrutura molecular da fosfatase alcalina
Fonte: Kim e Wyckoff, 1991⁵⁰

3.3 Necrose tumoral pós-quimioterapia

O prognóstico dos pacientes diagnosticados com osteossarcoma, inicialmente depende do tamanho do tumor. No Brasil, os pacientes com tumores não metastáticos menores que 12 cm apresentam uma sobrevida de 65% em cinco anos, enquanto os que apresentam tumores maiores que 12 cm têm uma sobrevida de 52% em cinco anos³⁻⁵.

O prognóstico também dependerá da resposta a quimioterapia neo-adjuvante, assim como das margens cirúrgicas conseguidas no procedimento operatório. Sabemos que os pacientes com mais de 90% de necrose tumoral e com margens livres ao estudo da peça extraída na cirurgia, apresentam taxa de sobrevida acima de 65% em dez anos de seguimento. Entretanto, os não respondedores (necrose < 90%) tem um índice de sobrevida 15% menor no mesmo tempo de seguimento^{15,28,30-32}.

Após a ressecção do tumor, este será encaminhado para análise anatomopatológica, na qual se realizará o estudo da resposta do tumor à quimioterapia. O patologista analisará as amostras do tumor, utilizando uma amostra parcial da massa extraída, estudando em cada um dos quadrantes a porcentagem de células viáveis, ou seja, avaliando em cada uma das lâminas a porcentagem de necrose ou destruição do tumor, utilizando o índice de Huvos^{27,29}.

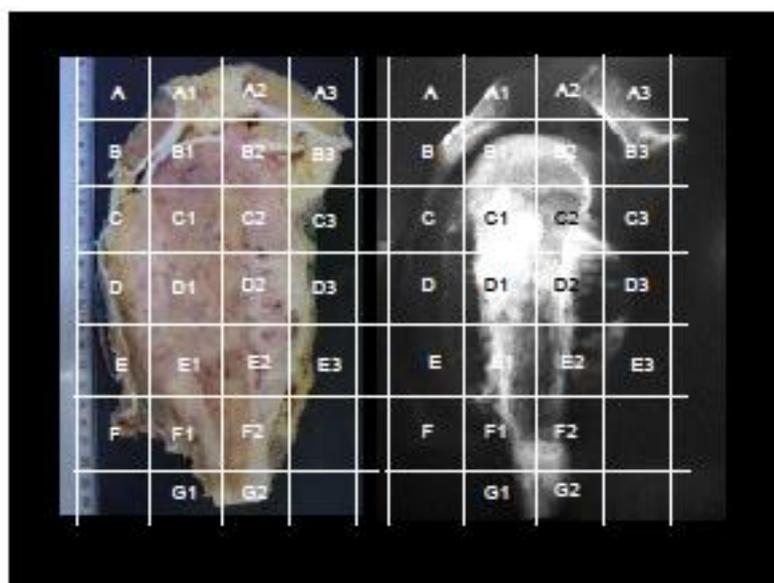


Figura 5. Preparação de uma peça cirúrgica com sua radiografia para análise anatomopatológica utilizando o método de Huvos
Fonte: Huvos, 1991²⁷

O índice de Huvos foi desenvolvido em 1977, quando Huvos et al.³³ visaram obter um método de avaliação do grau de necrose tumoral. Este grau foi obtido como porcentagem no estudo anatomopatológico das peças cirúrgicas extraídas, após realizada a quimioterapia pré-operatória. Este estudo analisa a resposta do tumor à quimioterapia, baseada na avaliação percentual de necrose e destruição do tumor após a realização da mesma (Quadro 1)^{4, 33}.

Quadro 1. Resposta do tumor a quimioterapia (índice de Huvos)

Índice de Huvos	
Grau I	Houve mínimo ou nenhum efeito da quimioterapia pré-operatória no tumor (< 50%).
Grau II	A resposta foi parcial, com 51 a 90 % de necrose
Grau III	Houve mais do que 90% de necrose, mas focos de tumor viável são vistos em algumas lâminas (90 a 99 %).
Grau IV	Não se encontrou nenhuma área de tumor viável (100 %).

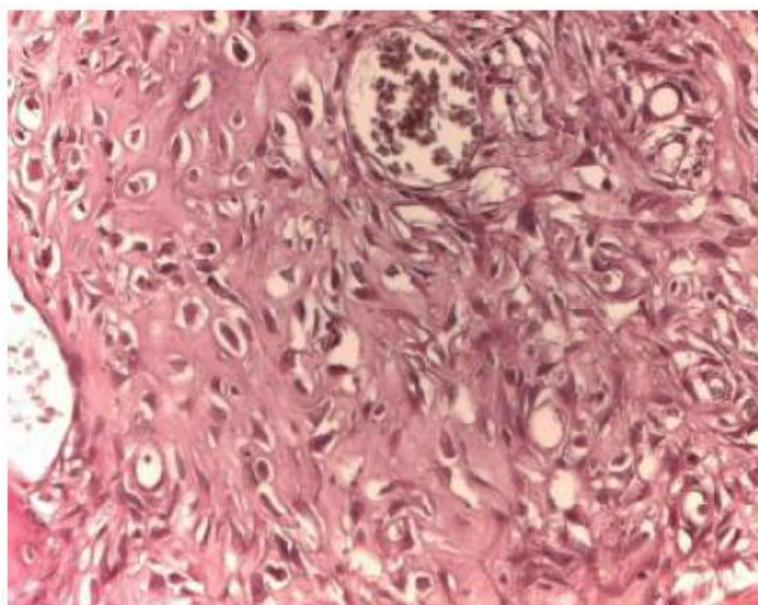


Figura 6. Fotomicrografia mostrando necrose tumoral pós-quimioterapia segundo o Índice de Huvos
Fonte: Bispo Júnior, 2009⁵¹

3.4 Prognóstico nos doentes com osteossarcoma

Além do tamanho do tumor e da resposta do mesmo à quimioterapia neoadjuvante, existem estudos realizados com o objetivo específico de pesquisar se existe uma relação entre os valores da FA e da DHL e o prognóstico dos pacientes diagnosticados com osteossarcoma.

No estudo para avaliar o prognóstico dos pacientes com osteossarcoma, Bramer et al.²¹, em 2005, classificaram os mesmos em três grupos, os quais foram divididos pelos valores sorológicos da FA obtidos no início do seguimento clínico; antes da quimioterapia pré-operatória, antes da cirurgia e depois da quimioterapia pós-operatória. No grupo 1 ou normal, foram incluídos os pacientes com valores normais da FA, no grupo 2 ou alto, foram incluídos os pacientes com valores entre 100% e 200% do valor normal da FA, e no grupo 3, ou muito alto, os pacientes com valores maiores que 200% do valor normal da FA. Foram estudados 89 pacientes, todos maiores que 18 anos de idade e sem apresentar metástase. Bramer et al.²¹ concluíram que os pacientes com diminuição do valor da FA na medição após a quimioterapia pré-operatória, teriam um prognóstico de sobrevida melhor, sendo que os pacientes com aumento no valor da FA na medição pós-operatória, teriam uma pior resposta ao tratamento da doença.

Ambroszkiewicz et al.¹⁷, em 2010, utilizaram como prognóstico para o osteossarcoma em adolescentes, os valores reportados de alguns marcadores ósseos

como a FA, osteocalcina (OC) e o telopeptídeo C-terminal (CTx), na monitorização da doença durante o tratamento do osteossarcoma. No estudo foram comparados os valores dos marcadores ósseos mencionados entre um grupo de 55 pacientes com diagnóstico de OS e um grupo de 60 pacientes sem OS. A idade média dos pacientes incluídos no estudo foi de 15 anos. Eles observaram que os valores da FA nos pacientes com OS antes do tratamento e os pacientes sem OS eram similares. Estes valores de FA durante a quimioterapia diminuíram em até 30% em relação aos valores iniciais. Também foi observado que nos pacientes nos quais a doença progrediu, os valores da FA aumentaram. Com esses dados Ambroszkiewicz et al., 2010¹⁷, concluíram que os pacientes de menor resposta ao tratamento e com pior prognóstico de sobrevida, apresentaram valores mais altos de FA quando comparados com os pacientes com a doença em remissão.

O prognóstico dos pacientes com metástase continua sendo desfavorável. Os valores sorológicos da DHL foram utilizados por López-Aguilar et al.²⁰, em 1996, para investigar o prognóstico com relação a metástase pulmonar nos pacientes diagnosticados com OS. Neste estudo, os autores estudaram os valores de DHL em 18 pacientes com diagnóstico de OS. Os pacientes foram divididos em dois grupos: A e B. No grupo A foram incluídos dez pacientes com valores elevados de DHL e no grupo B, oito pacientes com valores normais de DHL. Após 12 meses de seguimento foi observado que nove dos dez pacientes com o valor de DHL elevado, apresentaram metástase pulmonar. Os autores concluíram que o valor elevado de DHL está associado a um pior prognóstico nos pacientes com OS. López-Aguilar et al., 2006²⁰, também consideraram que a DHL como medida isolada teria valor

limitado no prognóstico da doença, sendo também necessário considerar outros fatores como o subtipo do OS, a idade do paciente e o tamanho do tumor entre outros.

Também os valores de FA e a DHL foram utilizados como marcadores tumorais de prognóstico em outros tumores ósseos malignos além do OS. Nos trabalhos publicados por Brozmanová et al.²², em 1973 e Bacci et al.^{18,19}, em 1988 e 1999, os autores também sugerem que quando os valores destes marcadores tumorais se encontram elevados, o prognóstico do paciente piora. Brozmanová et al.²², 1973, estudaram os valores da FA como prognóstico para o sarcoma de Ewing, osteosarcoma, condrosarcoma e fibrosarcoma enquanto Bacci et al.^{18,19}, 1988 e 1999, estudaram a relação de DHL com o sarcoma de Ewing.

Apesar de haver estudos correlacionando os valores FA e DHL com o prognóstico dos doentes com osteossarcoma, existe uma lacuna na literatura quando pesquisamos a correlação direta destes valores com a porcentagem de necrose tumoral pós-quimioterapia. Não existe um estudo no nosso meio que pesquisou se existe uma relação entre estas variáveis ou não. A importância de constatar se existe ou não esta relação é importante, já que permitiria um maior entendimento do curso da doença em cada paciente, possibilitando a divisão destes doentes em grupos de alto e baixo risco, baseados nos valores séricos de FA e DHL. Portanto, esta relação é de grande importância ao conhecimento desta doença.

Neste contexto, o objetivo deste estudo é correlacionar a porcentagem de necrose tumoral pós-quimioterapia com os valores séricos da FA e da DHL, sendo estas mensuradas no início do estadiamento e logo após a quimioterapia pré-operatória em pacientes com osteossarcoma atendidos em nosso serviço, justificando assim a realização deste estudo para um melhor entendimento do curso desta doença em nosso meio.

4. MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 Ética

O projeto de pesquisa foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo D).

4.2 Amostra

Este trabalho é um estudo retrospectivo transversal e foram utilizados os prontuários de pacientes diagnosticados com osteossarcoma que foram tratados pelo Grupo de Oncologia Ortopédica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP), no período de 1990 até o início de 2013.

4.3 Critérios de inclusão

Pacientes diagnosticados com osteossarcoma, mediante estudo anatomopatológico, que tenham registrado a medição sanguínea de FA e DHL antes e depois da quimioterapia pré-operatória e a necrose pós-quimioterapia da peça.

4.4 Critérios de exclusão

Prontuários incompletos.

4.5 Casuísta

Foram estudados 647 prontuários de pacientes com diagnóstico anatomopatológico de OS. Obtivemos dos prontuários as seguintes informações epidemiológicas: gênero, localização anatômica do tumor, diagnóstico histológico e idade do paciente (ANEXO A).

Destes, 510 foram excluídos por não apresentar dados completos para a análise posterior. Foram incluídos no total 137 prontuários. Os valores séricos da FA e da

DHL dos pacientes incluídos foram obtidos na realização do estadiamento, antes da quimioterapia pré-operatória e os valores reportados após a finalização da quimioterapia pré-operatória. Também foi coletado o percentual de necrose tumoral de cada peça extraída na cirurgia. Os dados descritivos da amostra foram expressos na Tabela 1.

Com 46,4%, o osteossarcoma osteoblástico foi o diagnóstico anatomopatológico prevalente seguido por osteossarcoma clássico (21,7%), condroblástico (13%), telangiectásico (5,8%). Os outros diagnósticos reportados foram todos menores aos 5%.

A idade média dos pacientes foi de 23 anos, com um desvio padrão de $\pm 14,5$ anos. A maioria dos pacientes foi do sexo masculino, com uma porcentagem de 65,9%, sendo o sexo feminino só o 34,1%. A localização mais freqüente foi o fêmur com 56,5%, seguido da tíbia com 18,8%.

Não houve diferença estatística enquanto ao local do tumor.

Tabela 1 - Descrição das características dos pacientes e da doença

Variável	Frequência	%
Idade (anos):	Média 2,01, DP	
14,6		
Gênero		
Feminino	47	34,3
Masculino	90	65,7
Local Tumor		
COSTELA	1	0,7
ESCAPULA	2	1,5
FEMUR	78	56,9
FIBULA	9	6,6
ILIACO	4	2,9
JOELHO	3	2,2
MANDIBULA	1	0,7
PERNA	1	0,7
TIBIA	25	18,2
ULNA	1	0,7
UMERO	12	8,8
Lateralidade		
Direito	69	50,4
Esquerdo	68	49,6
TOTAL	137	100

Legenda: DP: desvio padrão

4.6 Método

Classificamos os resultados da FA e DHL obtidos em dois grupos. No grupo 1 os pacientes com valores normais de FA e DHL, segundo os valores de referência do laboratório do HCFMUSP (DHL entre 24 e 480U/L, FA entre 35 e 130U/L, análise realizada pela máquina COBAS modular da Roche/Hitachi). No grupo 2, os

pacientes com valores acima do limite de normalidade. A classificação utilizada para agrupar os valores sorológicos em investigação foi adaptada do trabalho realizado por Bramer et. al. em 2005²¹.

Foi reportada a porcentagem de necrose tumoral descrita pelos patologistas, obtida das peças extraídas nas cirurgias realizadas pós quimioterapia. Esta porcentagem foi utilizada de acordo com a classificação de Huvos, dividindo o grau de necrose em quatro grupos. Huvos I: pequeno efeito da quimioterapia, até 50%. Huvos II: resposta parcial, representada de 51 - 90% de necrose tumoral. Tumor viável está presente. Huvos III: de 90 - 99% do tumor se encontra necrótico, no entanto focos de células tumorais (possivelmente viáveis) são encontrados. Huvos IV: houve um máximo efeito quimioterápico, 100% de necrose. Nenhuma célula tumoral é encontrada (Quadro 1).

Os dados foram expressos através de média e desvio-padrão.

4.7 Análise estatística

Para verificar a existência da relação da porcentagem de necrose tumoral (classificação mediante o índice de Huvos) com os valores séricos das enzimas, pré e pós-quimioterapia ou variação com a mesma, foram feitas as seguintes análises estatísticas:

Foram descritas as características nominais dos pacientes com uso de frequências absolutas e relativas. As idades dos pacientes foram descritas com uso de média e desvio padrão (Kirkwood e Sterne, 2006)⁵³.

Os valores da FA e DHL e suas variações com a quimioterapia assim como a porcentagem de necrose tumoral da peça cirúrgica, foram descritas com uso de medidas resumo (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo)⁵³.

Foram calculadas as correlações da necrose da peça cirúrgica (Huvos) com as enzimas pré, pós e alteração (pós - pré) quimioterapia e também entre as enzimas, com uso de correlações de Spearman para verificar a existência de correlação entre elas⁵³.

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%. Os softwares utilizados para a avaliação estatística foram o SPSS 20.0 (Statistical Program for Social Science for Windows versão 20.0) e o Microsoft Excel 2008.

5. *RESULTADOS*

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos valores de fosfatase alcalina e desidrogenase láctica com a porcentagem de necrose tumoral

Tanto a FA como a DHL diminuíram nos pacientes estudados quando comparado o valor pré-quimioterapia e pós-quimioterapia. A média da diferença da FA obtida pré-quimioterapia e pós-quimioterapia foi de 795,12 U/L sendo o valor pré QT maior ao valor pós QT. A diferença entre os valores da DHL pré-quimioterapia e pós-quimioterapia foi de menos 437,40 U/L, sendo o valor pré QT maior ao valor pós QT.

A média do valor da porcentagem de necrose tumoral foi de 34,12 % (DP 24,09). O valor mínimo e máximo variou de 0% a 100% de necrose tumoral, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição das enzimas, suas variações com a quimioterapia e a porcentagem de necrose tumoral da peça cirúrgica

Variável	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N
FA pré (U/L)	3418,53	5125,13	1717,0	48	31282	137
FA pós (U/L)	2636,47	3647,75	1567,0	48	23170	137
Varição FA (pós - pré) (U/L)	-782,07	4131,78	-7,0	-24682	11056	137
DHL pré (U/L)	6815,58	7046,09	5833,0	55	39149	137
DHL pós (U/L)	6378,18	9231,30	5900,0	193	94613	137
Varição DHL (pós - pré) (U/L)	-437,40	9427,05	35,0	-28665	87730	137
Huvos (%)	34,10	24,184	28,00	0	100	137

Legenda: FA: fosfatase alcalina; DHL: desidrogenase láctica; DP: desvio padrão; N: número

5.2 Alterações dos valores iniciais da medição de fosfatase alcalina e desidrogenase láctica após a quimioterapia pré-operatória

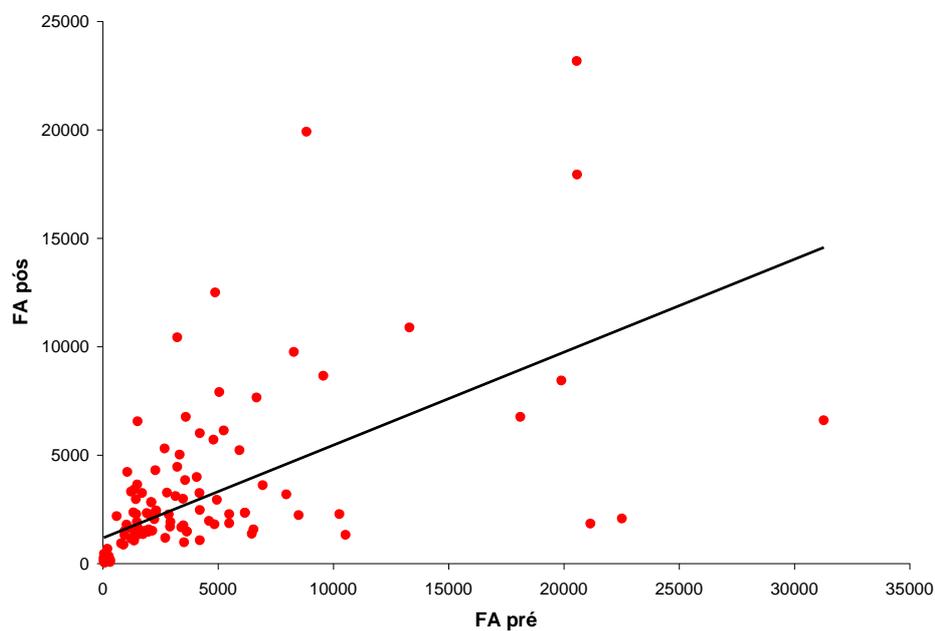
Não houve correlação estatisticamente significativa entre o índice de Huvos e os valores da FA e DHL. A ausência da relação foi observada tanto com os valores pré-quimioterapia, quanto com os valores pós-quimioterapia, não obtendo correlação com a alteração das enzimas após a quimioterapia ($p < 0,05$).

Entre a FA e a DHL houve correlação direta em cada momento de avaliação assim como relação entre o valor pré com o pós-quimioterapia na mesma enzima ($p < 0,05$). Estes resultados se encontram na Tabela 3 e nos Gráficos 1- 6.

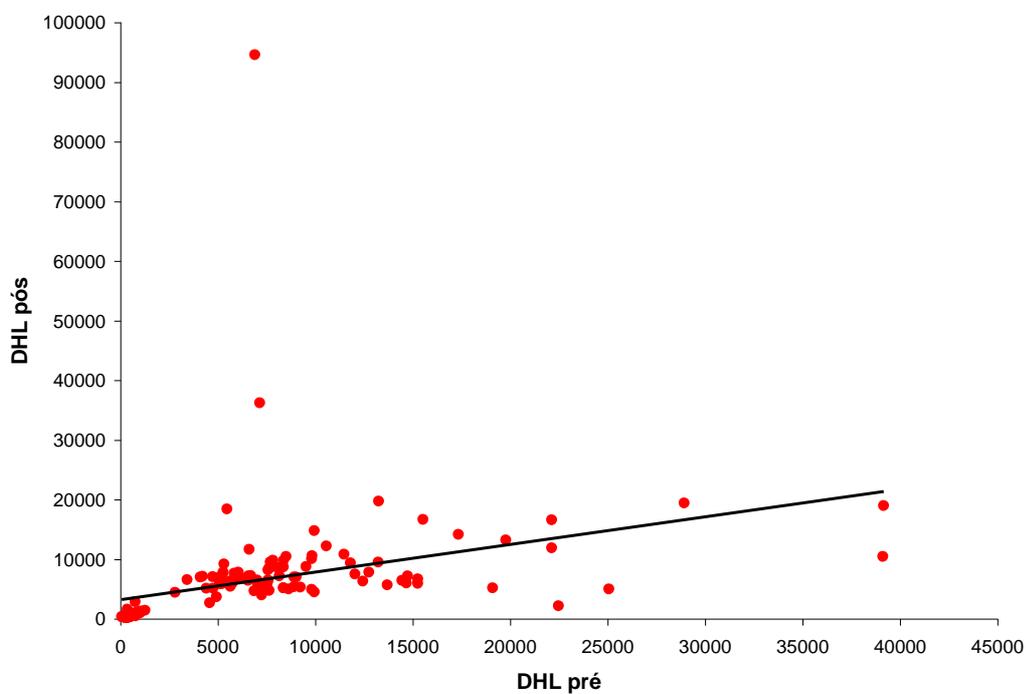
Tabela 3 - Resultado das correlações do índice de Huvos com os valores da DHL e FA, e entre as enzimas em cada momento da avaliação e suas variações após quimioterapia

Correlação		Huvo	FA pré	FA pós	Varição FA (pós - pré)	DHL pré	DHL pós
FA pré	r	-0,119					
	p	0,166					
	N	137					
FA pós	r	-0,100	0,804				
	p	0,244	<0,001				
	N	137	137				
Varição FA (pós - pré)	r	0,044	-0,351	0,171			
	p	0,613	<0,001	0,046			
	N	137	137	137			
DHL pré	r	-0,123	0,836	0,701	-0,229		
	p	0,151	<0,001	<0,001	0,007		
	N	137	137	137	137		
DHL pós	r	-0,054	0,717	0,788	0,027	0,773	
	p	0,527	<0,001	<0,001	0,757	<0,001	
	N	137	137	137	137	137	
Varição DHL (pós - pré)	r	0,089	-0,232	0,094	0,471	-0,386	0,185
	p	0,301	0,006	0,276	<0,001	<0,001	0,030
	N	137	137	137	137	137	137

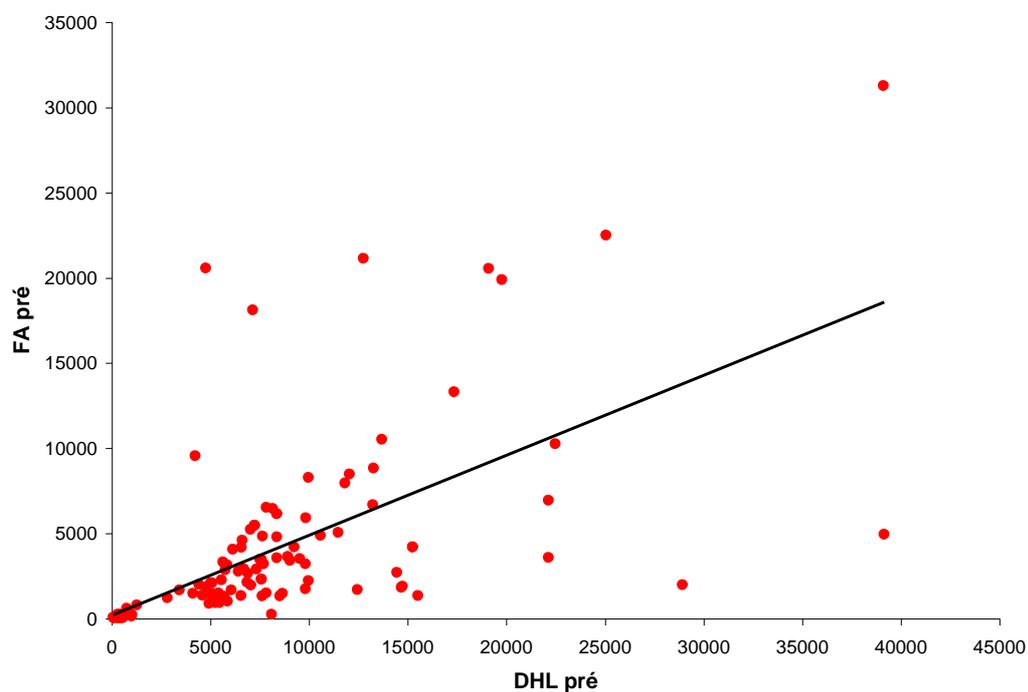
Legenda: FA: fosfatase alcalina; DHL: desidrogenase láctica; N: número

Gráfico 1 - Diagrama de dispersão entre FA pré e FA pós-quimioterapia

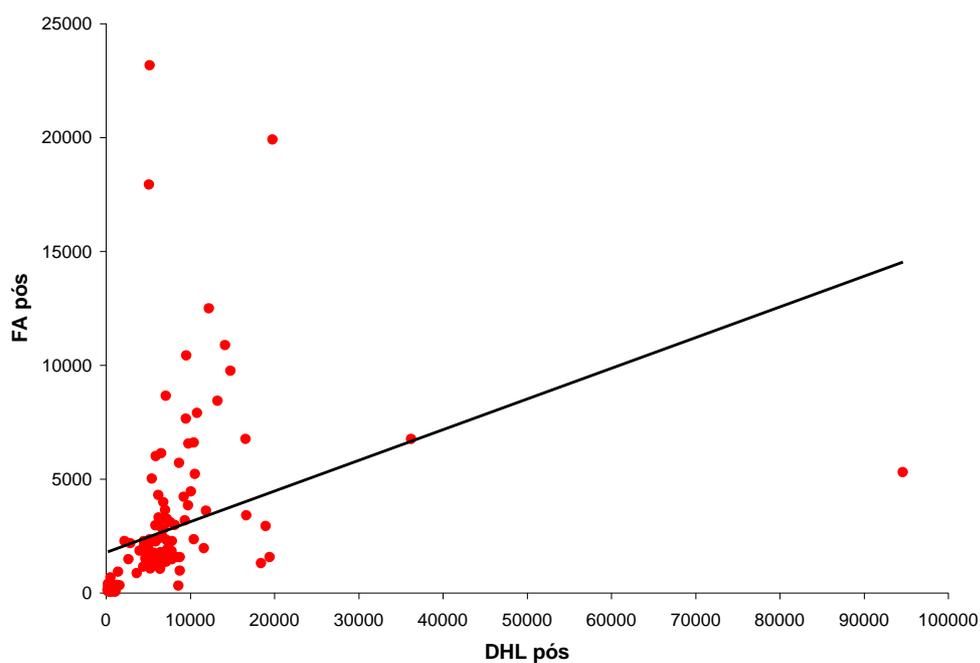
Legenda: FA: fosfatase alcalina

Gráfico 2 - Diagrama de dispersão entre DHL pré e DHL pós-quimioterapia

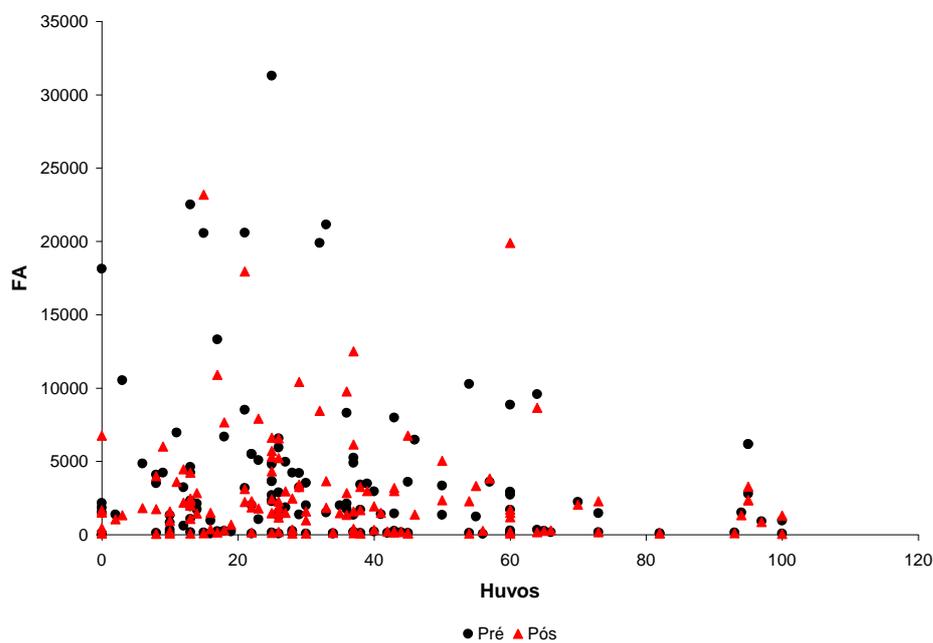
Legenda: DHL: desidrogenase láctica

Gráfico 3 - Diagrama de dispersão entre DHL pré e FA pré-quimioterapia

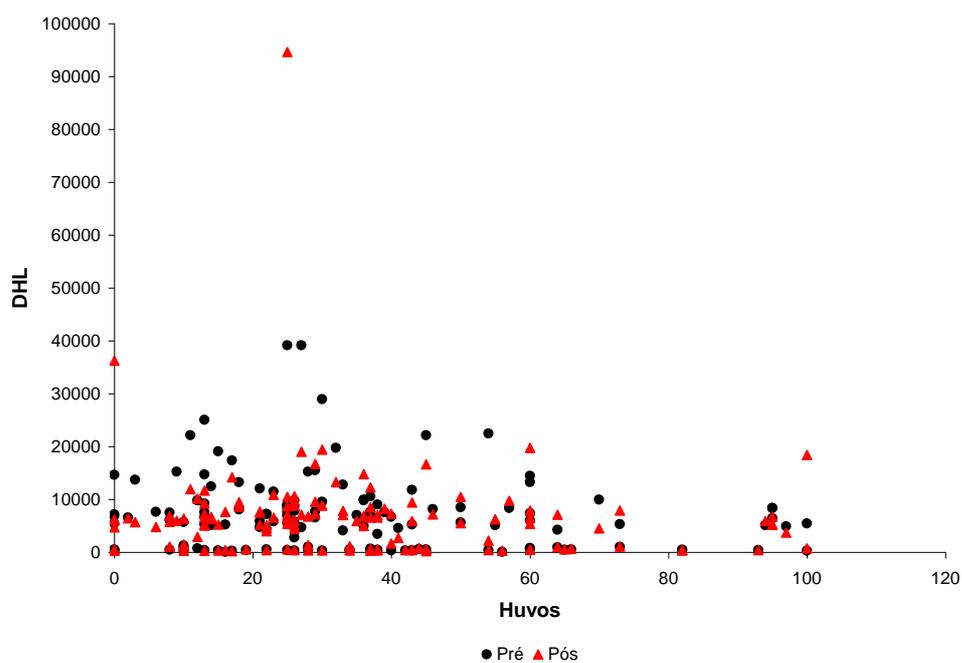
Legenda: FA: fosfatase alcalina; DHL: desidrogenase láctica

Gráfico 4 - Diagrama de dispersão entre DHL pós e FA pós-quimioterapia

Legenda: FA: fosfatase alcalina; DHL: desidrogenase láctica

Gráfico 5 - Diagrama de dispersão entre Huvos e FA pré e pós-quimioterapia

Legenda: FA: fosfatase alcalina

Gráfico 6 - Diagrama de dispersão entre Huvos e DHL pré e pós quimioterapia

Legenda: DHL: desidrogenase láctica

6. *DISCUSSÃO*

6 DISCUSSÃO

O OS é o tumor ósseo primário mais comum, se apresentando com maior frequência nas diáfises dos ossos longos, e tendo predileção pelo sexo masculino com aparecimento geralmente na segunda década da vida. Este conhecimento sobre a doença é universalmente aceito, já que esta informação é similar em todos os textos e estudos que abordam qualquer tipo de investigação sobre o OS¹⁻⁸.

No presente estudo, os resultados são compatíveis aos encontrados na literatura. Dos 137 pacientes com diagnóstico de OS, 65,7% foram do sexo masculino. Também observamos que os ossos longos foram os locais mais frequentes de acometimento do tumor, com 91,9%. Da mesma forma, a média da idade dos pacientes que fizeram parte do estudo foi de 23,1 anos. Assim, observou-se que esses dados são congruentes com a casuística observada na literatura.

O intuito principal deste estudo foi verificar se existe correlação entre os valores séricos de FA e DHL e a porcentagem de necrose tumoral pós-quimioterapia. Encontramos diversas publicações nas quais foram medidos os valores de diversos marcadores ósseos para correlacionar com o prognóstico do paciente com OS.

Ambroszkiewicz et al.¹⁷, em 2010, utilizaram como prognóstico para o OS em adolescentes, os valores reportados de FA, osteocalcina (OC) e telopeptídeo C-terminal (CTx), na monitorização da doença durante o tratamento. Concluíram que

os pacientes com menor resposta ao tratamento, e com pior prognóstico de sobrevida, apresentaram valores mais altos de FA quando comparados com os pacientes com a doença em remissão.

No trabalho de Bramer et al.²¹, em 2005, para avaliar o prognóstico dos pacientes com OS, classificaram os pacientes em três grupos. No grupo 1 ou NORMAL, foram incluídos os pacientes com valores normais da FA, no grupo 2 ou ALTO, incluíram os pacientes com valores entre 100% e 200% do valor normal da FA, e no grupo 3 ou MUITO ALTO, os pacientes com valores maiores a 200% do valor normal da FA.

No presente estudo, os pacientes foram divididos em dois grupos. O grupo 1 foi formado com os pacientes que apresentaram valores normais da FA e DHL. Da mesma forma, o grupo 2 foi formado com os pacientes que apresentaram valores elevados da FA e da DHL. É importante mencionar que neste estudo foram obtidos os valores de FA e DHL tanto pré-quimioterapia como pós-quimioterapia.

Bramer et al.²¹, em 2005 estudou 89 pacientes, todos maiores que 18 anos de idade e sem apresentar metástase. A conclusão foi que os pacientes com diminuição do valor da FA na medição após a quimioterapia pré-operatória, teriam um prognóstico de sobrevida melhor, sendo que os pacientes com aumento no valor da FA na medição pós-operatória, teriam um pior prognóstico.

Na presente investigação, foram incluídos 137 pacientes, sem discriminação de idade, e o único critério de inclusão foi o diagnóstico de OS confirmado mediante biópsia. A conclusão foi que não existe relação entre os valores de FA e DHL com a porcentagem de necrose tumoral calculada pelo índice de Huvos. Isto indica que os valores de FA e DHL não apresentam correlação com o prognóstico de sobrevida do paciente.

No estudo de González-Billalabeiti et al.³⁴, em 2009, foram avaliados 66 pacientes com diagnóstico de OS num período de 25 anos (junho de 1977 até março de 2003), a média da idade dos pacientes foi de 15 anos. Neste trabalho eles avaliaram a significância dos valores de DHL como fator prognóstico na sobrevida dos pacientes. Os pesquisadores utilizaram os valores da DHL pré-quimioterapia dos prontuários. Concluíram que os pacientes que apresentaram níveis altos da DHL tiveram um pior prognóstico de sobrevida no seguimento, tanto no período livre da doença, como no período de sobrevida global do OS.

No trabalho aqui apresentado, foram estudados 137 pacientes num período de 23 anos. Os prontuários escolhidos iniciaram no ano de 1989 e finalizaram em mediados de 2013. Como mencionado anteriormente, a média da idade foi de 23,1 anos. Colhemos os valores séricos da DHL tanto pré como pós-quimioterapia, com o intuito de observar a significância desses valores em relação a porcentagem de necrose tumoral reportada pelos patologistas. Concluímos, que ao contrario de González-Billalabeitia et al.³⁴ (2009), não existe relação entre os valores séricos da

DHL e a porcentagem de necrose tumoral; o que indica que a sobrevida do paciente não se correlaciona com os valores deste marcador ósseo.

Em uma publicação similar à de González-Billalabeitia et al.³⁴ (2009), Bacci et al.³⁵ (2004), obtiveram os valores séricos da DHL dos prontuários por um período de 30 anos, obtendo os valores desse marcador ósseo em 1421 pacientes. O objetivo do estudo foi avaliar a correlação entre os valores da DHL pré-quimioterapia com o prognóstico da doença em relação ao estágio clínico e a sobrevida global da mesma. Eles reportaram que os valores de DHL sempre foram maiores nos pacientes com a doença em estádios mais avançados (metastática), não sendo assim nos pacientes com a doença localizada. Também reportaram que nos pacientes em estádios avançados do OS, o prognóstico foi pior quando o nível de DHL estava elevado. Por último, eles concluíram que nos pacientes com a doença localizada, os valores da DHL não têm uma relação direta com o prognóstico do paciente.

No presente estudo, como o critério de inclusão era ter medições da DHL pré e pós-quimioterapia, foram excluídos 510 pacientes. O objetivo foi correlacionar os valores séricos da DHL pré e pós-quimioterapia com a porcentagem de necrose tumoral expressada através do índice de Huvos. Não foram discriminados os pacientes pelo estágio da doença, sendo esta outra diferença importante com o estudo de Bacci et al.³⁵, em 2004. Finalmente concluímos que não existe relação entre os valores séricos de DHL com o prognóstico de sobrevida global do paciente, sendo esta conclusão concordante com a reportada por Bacci et al.³⁵ (2004).

López-Aguilar et al.²⁰, em 1996, publicaram um trabalho no qual investigaram se a DHL seria um fator prognóstico para a metástase pulmonar do OS. A investigação incluiu 18 pacientes divididos em dois grupos. No grupo A incluíram pacientes com valores elevados de DHL e no grupo B pacientes com valores normais. Foi observado que 90% dos pacientes do grupo A, apresentaram metástase pulmonar, sugerindo que o valor elevado de DHL indicaria um pior prognóstico nos pacientes com OS. Eles também consideraram que a DHL como fator isolado teria valor limitado no prognóstico da doença.

Nosso estudo também divide os pacientes em dois grupos. O grupo com os valores de DHL dentro de parâmetros normais e o grupo com os valores de DHL elevada. Novamente uma diferença importante é que este trabalho apresenta duas medições de DHL, a pré-quimioterapia e a pós-quimioterapia. Finalmente obtivemos uma conclusão similar, a DHL não pode ser considerada como um fator prognóstico de importância no OS.

Bacci et al.³⁶, em 2002, realizaram um estudo no qual mediram os valores séricos da FA em 560 pacientes com OS. O objetivo do estudo foi avaliar a correlação entre os valores da FA pré-quimioterapia com o prognóstico da doença em relação ao tratamento utilizado. Encontraram valores altos de FA em 46% dos pacientes estudados. Não reportaram uma diferença significativa no prognóstico dos pacientes em relação aos valores da FA. Concluíram que o prognóstico varia dependendo do protocolo de quimioterapia que é utilizado.

No presente estudo não consideramos os diferentes protocolos de quimioterapia utilizados para o tratamento do OS. Incluímos valores de FA tanto pré como pós-quimioterapia. A conclusão de forma similar não indica que o marcador mencionado mantém uma relação direta com o prognóstico do OS.

Limmahakhun et al.³⁷, em 2011, realizaram um estudo para analisar a importância de diversos marcadores ósseos na progressão e no prognóstico dos pacientes com OS. Eles compararam no estudo os valores pré-tratamento de FA e DHL em 28 pacientes com OS e em 30 pacientes sem a doença. Concluíram que unicamente a FA apresentou valores elevados nos pacientes com OS. No entanto, o valor foi normal nos pacientes sem a doença. Para a DHL foram descritos valores normais tanto em pacientes doentes como em pacientes saudáveis. Finalmente, também descrevem que os marcadores sorológicos não devem ser considerados como fatores prognósticos de grande importância no OS.

No presente estudo, também medimos os valores de FA e DHL em pacientes com OS, porém não incluímos um grupo controle de pacientes saudáveis. Reportamos valores normais e elevados de ambos os marcadores nos pacientes. Concluímos igualmente que a FA e a DHL não tem relação íntima com o prognóstico da doença mencionada.

Na publicação de Adamkova Krakorova et al.³⁸, em 2012, foram estudados 36 pacientes com idade média de 28.5 anos, diagnosticados com OS. O 70% dos pacientes tiveram uma resposta pobre a quimioterapia, tendo um tempo de sobrevida

de 23 meses aproximadamente. Como parte do seguimento, foram obtidos valores de FA e DHL durante a evolução da doença. Como resultado, os valores dos marcadores estudados não foram de importância significativa na evolução do OS, sendo que a resposta à quimioterapia, assim como o resultado da cirurgia, foram mais fidedignos.

No trabalho aqui apresentado, foi estudada a resposta à necrose tumoral como fator prognóstico, correlacionando a mesma com os valores encontrados de FA e DHL tanto pré como pós-quimioterapia. Concluímos que o índice de necrose tumoral não tem relação com os marcadores mencionados, concordando com que a FA e a DHL não tem grande valor prognóstico no OS.

Em dois trabalhos publicados por Meyers et al.³⁹⁻⁴⁰, em 1992 e em 1993, diversos fatores como a idade, o sexo, a localização, a resposta à quimioterapia e os valores medidos de FA e DHL. Foram analisados como prognóstico do OS tanto em pacientes com a doença localizada, como nos que já tinham metástase. Eles concluíram que a idade, o sexo e a localização não têm valor prognóstico para pacientes com a doença localizada ou metastática. A resposta à quimioterapia e os valores de FA e DHL teve valor prognóstico importante no OS. Descreveram que tanto em pacientes com a doença localizada como com metástase, a sobrevida diminuía se os valores de FA e DHL eram altos.

No presente estudo, observamos fatores como idade, sexo e localização do tumor, sem a intenção de estudar o valor prognóstico dos mesmos. As medições de

FA e DHL foram correlacionadas com o grau de necrose tumoral que apresentou a peça cirúrgica. Também foram obtidas medidas dos marcadores antes e depois do tratamento quimioterápico. O resultado foi que o valor da FA e da DHL não tem relação com a necrose tumoral reportada, não sendo fatores prognósticos do OS.

Ferrari et al.⁴¹⁻⁴², em 2001 e 2006, utilizaram as medições dos valores da FA e a DHL com o propósito de analisar se os marcadores mencionados eram fatores prognósticos de importância para pacientes com OS localizado e para pacientes com recidiva. A conclusão foi que os marcadores não são fatores fundamentais no prognóstico da doença, mesmo quando em estádios avançados.

Neste trabalho o resultado foi similar. A FA e a DHL não são fatores importantes para o índice de Huvos reportado das peças cirúrgicas dos pacientes estudados. Por este motivo, também concluímos que os marcadores mencionados não são fatores prognósticos importantes para o seguimento do OS.

Durnali et al.⁴³, em 2013, realizaram um estudo multicêntrico retrospectivo com a finalidade de avaliar os fatores prognósticos de pacientes diagnosticados com OS. Foram incluídos 240 pacientes com idade média de 20 anos, os quais apresentaram a doença entre março de 1995 e setembro de 2011. Não foi discriminado o estágio da doença, o sexo, a idade ou a localização do tumor. Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com os valores apresentados de FA e DHL, pré-quimioterapia, imitando o modelo de Bramer et al.²¹, em 2005, estudo antes mencionado. Não foi estudada a resposta à necrose tumoral mediante o

índice de Huvos. Concluíram que a FA e a DHL são fatores prognósticos importantes para o seguimento do avanço do OS.

Os resultados em nosso estudo nos levaram a uma conclusão diferente, sendo que a resposta da necrose tumoral não teve correlação com os valores de FA e DHL, fazendo que mencionados marcadores não sejam importantes indicadores do prognóstico do OS.

Finalmente este estudo é o primeiro em nosso meio que avalia a correlação entre os valores séricos de FA e DHL com a resposta do tumor ao tratamento, ou seja, a porcentagem de necrose tumoral medida a través do índice de Huvos. Também é um dos poucos que avalia tanto os valores de FA e DHL pré como pós-quimioterapia.

Apesar de nós termos estudado a porcentagem de necrose tumoral com a sobrevida; é provável que exista essa correlação como diversos estudos já provaram, mas não foi o objetivo do trabalho.

7. CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Os níveis séricos de FA e da DHL não são fatores preditivos sobre a resposta tumoral à quimioterapia pré-operatória em pacientes portadores de osteossarcoma.

8. *ANEXOS*

8 ANEXOS**ANEXO A**

Dados	
Nome:	_____
RGHC:	_____
Gênero:	Feminino _____ Masculino _____
Localização do Tumor:	_____
Data da Biopsia:	_____
Resultado da Biopsia:	_____
Diagnóstico:	_____
Valor Inicial de FA:	Normal (grupo 1) _____ Acima do valor normal (grupo 2) _____
Valor Inicial da DHL:	Normal (grupo 1) _____ Acima do valor normal (grupo 2) _____
Grau de Necrose Tumoral:	Huvos I _____ Huvos II _____ Huvos III _____ Huvos IV _____
Valor de FA após a quimioterapia pré-operatória:	Normal (grupo 1) _____ Acima do valor normal (grupo 2) _____
Valor da DHL após a quimioterapia pré-operatória:	Normal (grupo 1) _____ Acima do valor normal (grupo 2) _____

ANEXO B

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que estou ciente e concordo com as etapas previstas para serem realizadas junto a **Disciplina de Oncologia Ortopédica** do DOT-FMUSP, relativas ao Projeto de Pesquisa intitulado "**Correlação entre os valores séricos de fosfatase alcalina e de desidrogenase láctica e a porcentagem de necrose tumoral pós quimioterapia no osteossarcoma**" proposto pelo(a) pesquisador(a) **Juan Pablo Zumárraga Montaña** e que os respectivos procedimentos são factíveis nos prazos exigidos desde que respeitando o cronograma proposto.

São Paulo, 23 de Novembro de 2011.

Assinatura e Carimbo do Chefe da Disciplina

ANEXO C

**DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
FMUSP**

COMISSÃO CIENTÍFICA

CONTROLE DE PROTOCOLOS DE PESQUISA

Uso Reservado à Comissão Científica			Nº Protocolo
Assessor da Comissão Científica	/ /	Aprovação Comissão Científica	/ /
Aprovação Conselho DOT	/ /	Aprovação Câmara de Custos	/ /
Aprovação da CAPPesq / Início	/ /	Publicado - Final	/ /
DATA: de de 200 ASSINATURA:			
Título do Projeto de Pesquisa: "Correlação entre os valores séricos de fosfatase alcalina e de desidrogenase lática e a porcentagem de necrose tumoral pós quimioterapia no osteossarcoma "			
Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo E-Mail: olapcama@uol.com.br			
Pesquisador Executante: Dr. Juan Pablo Zumárraga Montano CPF: 231.730.478-18 E-Mail: juanpzumarraga@hotmail.com Endereço Completo: Rua Alves Guimarães 518 Apt 164 Pinheiros SP			
Tel. Residência () Celular (x) 11-94546662 Cons./outros ()			
Vínculo <input checked="" type="checkbox"/> IOT-HC-FMUSP <input type="checkbox"/> DOT-FMUSP <input type="checkbox"/> Outros:			
Motivo da Pesquisa:			
<input type="checkbox"/> Iniciação Científica / Estágio Curricular	<input type="checkbox"/> Título de Especialista (SBOT)		
<input type="checkbox"/> Aprimoramento / Aperfeiçoamento (CAP)	<input checked="" type="checkbox"/> Mestrado		
<input type="checkbox"/> Projeto Regular (Grupos / Disciplinas)	<input type="checkbox"/> Doutorado		
<input type="checkbox"/> Estágio Médico	<input type="checkbox"/> Livre-Docência		
<input type="checkbox"/> Financiamento externo (empresa contratante):			
<input type="checkbox"/> Acordo / Convênio:			
<input type="checkbox"/> Outros:			
Linha de Pesquisa:			
<input type="checkbox"/> Modelos para análise de lesões do sistema nervoso	<input checked="" type="checkbox"/> Modelos clínicos e epidemiológicos das alterações degenerativas e estruturais do aparelho locomotor		
<input type="checkbox"/> Desenvolvimento de ensaios e modelos para substituição articular	<input type="checkbox"/> Análise experimental da regeneração músculo-esquelética		
<input type="checkbox"/> Ensaios sobre instabilidades articulares	<input type="checkbox"/> Modelos clínicos e experimentais da análise funcional do movimento humano		

Tipo da Pesquisa Científica:		
<input type="checkbox"/>	Revisão Sistemática da Literatura / Metanálise	<input checked="" type="checkbox"/> Estudo Retrospectivo / Prontuários / Relato de Caso
<input type="checkbox"/>	Ensaio Randomizado (controlado, duplo-cego, etc)	Opinião de Especialista / Consenso / Atualização / Revisão
<input type="checkbox"/>	Est. Prospectivo com Controle, Não Randomizado / Coorte	Não Científica: _____
Outras Instituições Participantes:		
<input type="checkbox"/>	Outras Unidades HC, FMUSP ou USP:	_____
<input type="checkbox"/>	Instituições de Ensino e Pesquisa Externas:	_____
<input type="checkbox"/>	Instituições Privadas:	_____
Nome do Grupo: Grupo de Oncologia Ortopédica do IOT HCFMUSP		
Nome do Chefe do Grupo: Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo		

Os autores, abaixo assinados, declaram para os devidos fins que estão cientes e concordam com o protocolo de pesquisa em anexo e confirmam a participação como pesquisador envolvido (co-autor).

RELAÇÃO DE AUTORES EM ORDEM DE APARECIMENTO NA PUBLICAÇÃO		
1	Nome: Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo	Assinatura:
2	Nome: Dr. André Mathias Baptista	Assinatura:
3	Nome: Dra. Cláudia R.G.C.M. de Oliveira	Assinatura:
4	Nome: Dr. Marcelo Tadeu Caiero	Assinatura:
5	Nome:	Assinatura:
6	Nome:	Assinatura:
7	Nome:	Assinatura:
8	Nome:	Assinatura:

Os planos de pesquisa executados fora do complexo HCFMUSP, deverão ser aprovados anteriormente pela Comissão de Ética do Hospital / Instituição onde será desenvolvido e enviado posteriormente para a aprovação da CAPPesq.

Qualquer alteração no Plano de Pesquisa, ou do Título, deverá ser comunicado a esta Comissão Científica. O processo deverá ser instruído conforme os itens relacionados no Anexo I.

Deverá entregar o protocolo de pesquisa, conforme o **MANUAL DE INSTRUÇÃO PARA O ENCAMINHAMENTO DE PROJETOS DE PESQUISA PARA A CAPPesq** (segundo a instrução de serviço HC nº 01/98).

Conhecer os **REQUISITOS UNIFORMES PARA ORIGINAIS SUBMETIDOS A REVISTAS BIOMÉDICAS** Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (<http://www.acponline.org>).

Para as pesquisas com novos fármacos, medicamentos, vacinas ou testes diagnósticos deverá ser observada a **Norma de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos na Área Temática de Novos Fármacos, Medicamentos, Vacinas e Testes Diagnósticos – CEP / CONEP / MS** (Resolução do Conselho Nacional de Saúde Nº 251, de 7 de agosto de 1997).

Para as pesquisas envolvendo seres humanos deverá ser observada a resolução sobre os **Aspectos Éticos da Pesquisa em Humanos – CEP / CONEP / MS** (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/1996)

AO ENTREGAR O PROTOCOLO DE PESQUISA PARA APROVAÇÃO DA CAPPESQ / HCFMUSP, O(A) INTERESSADO(A) DEVERÁ FICAR COM UMA CÓPIA DE TODA A DOCUMENTAÇÃO.

O protocolo de pesquisa por mim proposto, não apresenta vínculo de qualquer natureza, inclusive financeiro, com instituição pública ou privada. Neste ato obrigo-me a comunicar formalmente ao Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP qualquer alteração que contrarie esta declaração no transcorrer e mesmo após o término do projeto; estando ciente das responsabilidades legais e sanções institucionais no descumprimento do presente termo. (ex.: equipamentos, ferramental, instrumental, material de consumo, viagens, medicamentos, doações, testes, divulgação, ajuda de custo, etc). **Não assinalar este item implica na admissão de patrocínio.**

São Paulo, 23 de Novembro de 2011

Assinatura do Pesquisador Responsável:

9. REFERÊNCIAS

9 REFERENCIAS

1. Raymond AK, Ayala AG, Knuutila S. Conventional osteossarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press; 2002. p.264-70. (World health organization classification of tumours, 4).
2. Hornicek FJ. Osteosarcoma of bone. In: Schwartz HS, editor. *Orthopaedic knowledge update 2: musculoskeletal tumors*. 2ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2007. p.163-74.
3. Dorfman HD, Czerniak B, editors. *Bone tumor*. St. Louis: Mosby; 1998. p.128-252: Osteosarcoma.
4. Garcia Filho RJ. *Diagnóstico e tratamento de tumores ósseos*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.125-200: Tumores produtores de tecido ósseo.
5. Garcia Filho RJ, organizador. *Clínica ortopédica da SBOT: tumores ósseos e sarcomas de tecidos moles*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. p.32-41: Tumores osteoblásticos: osteossarcoma.
6. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo demográfico 2000*. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 2013 abr 12.

7. Dorfman HD, Czerniak B, editors. *Bone tumor*. St. Louis: Mosby; 1998. p.607-36: Ewing's sarcoma and related entities.
8. Garcia Filho RJ, organizador. *Clínica ortopédica da SBOT: tumores ósseos e sarcomas de tecidos moles*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. p.75-82: Tumor de Ewing - PNET.
9. Garcia Filho RJ. *Diagnóstico e tratamento de tumores ósseos*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.311-55: Tumores da medula óssea.
10. Ushigome S, Machinami R, Sorensen PH. Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumour (PNET). In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press; 2002. p.297-300. (World health organization classification of tumours, 4).
11. Patterson FR, Basra SK. Ewing's sarcoma. In: Schwartz HS, editor. *Orthopaedic knowledge update 2: musculoskeletal tumors*. 2ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2007. p.175-84.
12. Aboulafia AJ, Levine AM, Schimdt DP. Biopsy. In: Schwartz HS, editor. *Orthopaedic knowledge update 2: musculoskeletal tumors*. 2ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2007. p.3-11.

13. Garcia Filho RJ. *Diagnóstico e tratamento de tumores ósseos*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.83-98: Biópsia.
14. Garcia Filho RJ. *Diagnóstico e tratamento de tumores ósseos*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.1-54: Diagnóstico dos tumores ósseos e sarcoma de partes moles.
15. Davis AM, Bell RS, Goodwin PJ. Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review. *J Clin Oncol*. 1994 Feb;12(2):423-31.
16. Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Klepacka T, Chelchowska M, Laskowska-Klita T, et al. A comparison of serum concentrations of biochemical bone turnover markers in patients with osteosarcoma with good and poor prognosis. *Pol Merkur Lekarski*. 2010 Jul;29(169):19-26.
17. Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Klepacka T, Chelchowska M, Laskowska-Klita T, et al. Clinical utility of biochemical bone turnover markers in children and adolescents with osteosarcoma. *Adv Med Sci*. 2010;55(2):266-72.
18. Bacci G, Avella M, McDonald D, Toni A, Orlandi M, Campanacci M. Serum lactate dehydrogenase (LDH) as a tumor marker in Ewing's sarcoma. *Tumori*. 1988 Dec 31;74(6):649-55.

19. Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Rimondini S, Versari M, Zanone A, et al. Prognostic significance of serum LDH in Ewing's sarcoma of bone. *Oncol Rep.* 1999 Jul-Aug;6(4):807-11.
20. López-Aguilar E, Rivera-Márquez H, Cerecedo-Díaz F, Peniche-Villalpando L. Lactic dehydrogenase as a prognostic factor in the development of pulmonary metastatic disease in patients with osteosarcoma. *Gac Med Mex.* 1996 Jul-Aug;132(4):363-6.
21. Bramer JA, Abudu AA, Tillman RM, Carter SR, Sumathi VP, Grimer RJ. Pre and post-chemotherapy alkaline phosphatase levels as prognostic indicators in adults with localised osteosarcoma. *Eur J Cancer.* 2005 Dec;41(18):2846-52.
22. Brozmanová E, Skrovina B. Serum alkaline phosphatase in malignant bone tumours (osteosarcoma, chondrosarcoma, fibrosarcoma, Ewing's sarcoma. *Neoplasma.* 1973;20(4):419-25.
23. Schönau E, Glöckel U, Beck HJ, Kruse K. High-molecular-mass or macromolecular alkaline phosphatase in sera of children with solid tumors. *Klin Padiatr.* 1994 Jan-Feb;206(1):36-9.
24. Garcia Filho RJ, organizador. *Clínica ortopédica da SBOT: tumores ósseos e sarcomas de tecidos moles.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. p.14-20. Biópsia do tecido ósseo.

25. Smeland S, Müller C, Alvegard TA, Wiklund T, Wiebe T, Björk O, Stenwig AE, et al. Scandinavian Sarcoma Group Osteosarcoma Study SSG VIII: prognostic factors for outcome and the role of replacement salvage chemotherapy for poor histological responders. *Eur J Cancer*. 2003 Mar;39(4):488-94.
26. Tuy BE. Adjuvant therapy for malignant bone tumors. In: Schwartz HS, editor. *Orthopaedic knowledge update 2: musculoskeletal tumors*. 2ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2007. p.205-18.
27. Huvos AG. *Bone tumors: diagnosis, treatment and prognosis*. 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1991.
28. Hudson M, Jaffe MR, Jaffe N, Ayala A, Raymond AK, Carrasco H, et al. Pediatric osteosarcoma: therapeutic strategies, results, and prognostic factors derived from a 10-year experience. *J Clin Oncol*. 1990 Dec;8(12):1988-97.
29. Huvos AG, Rosen G, Bretsky SS, Butler A. Telangiectatic osteogenic sarcoma: a clinicopathologic study of 124 patients. *Cancer*. 1982 Apr 15;49(8):1679-89.
30. Bieling P, Rehan N, Winkler P, Helmke K, Maas R, Fuchs N, et al. Tumor size and prognosis in aggressively treated osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1996 Mar;14(3):848-58.

31. Bacci G, Longhi A, Versari M, Mercuri M, Briccoli A, Picci P. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer*. 2006 Mar 1;106(5):1154-61.
32. Bramer JA, van Linge JH, Grimer RJ, Scholten RJ. Prognostic factors in localized extremity osteosarcoma: a systematic review. *Eur J Surg Oncol*. 2009 Oct;35(10):1030-6.
33. Huvos AG, Rosen G, Marcove RC. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch Pathol Lab Med*. 1977 Jan;101(1):14-8.
34. González-Billalabeitia E, Hitt R, Fernández J, Conde E, Martínez-Tello F, Enríquez de Salamanca R, Cortés-Funes H. Pre-treatment serum lactate dehydrogenase level is an important prognostic factor in high-grade extremity osteosarcoma. *Clin Transl Oncol*. 2009 Jul;11(7):479-83.
35. Bacci G, Longhi A, Ferrari S, Briccoli A, Donati D, De Paolis M, et al. Prognostic significance of serum lactate dehydrogenase in osteosarcoma of the extremity: experience at Rizzoli on 1421 patients treated over the last 30 years. *Tumori*. 2004 Sep-Oct;90(5):478-84.

36. Bacci G, Longhi A, Ferrari S, Lari S, Manfrini M, Donati D, Forni C, et al. Prognostic significance of serum alkaline phosphatase in osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: recent experience at Rizzoli Institute. *Oncol Rep.* 2002 Jan-Feb;9(1):171-5.
37. Limmahakhun S, Pothacharoen P, Theera-Umpon N, Arpornchayanon O, Leerapun T, Luevitoonvechkij S, et al. Relationships between serum biomarker levels and clinical presentation of human osteosarcomas. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(7):1717-22.
38. Adamkova Krakorova D, Vesely K, Zambo I, Tucek S, Tomasek J, Jureckova A, et al. Analysis of prognostic factors in osteosarcoma adult patients, a single institution experience. *Klin Onkol.* 2012;25(5):346-58.
39. Meyers PA, Heller G, Healey J, Huvos A, Lane J, Marcove R, et al. Chemotherapy for nonmetastatic osteogenic sarcoma: the Memorial Sloan-Kettering experience. *J Clin Oncol.* 1992 Jan;10(1):5-15.
40. Meyers PA, Heller G, Healey JH, Huvos A, Applewhite A, et al. Osteogenic sarcoma with clinically detectable metastasis at initial presentation. *J Clin Oncol.* 1993 Mar;11(3):449-53.

41. Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Picci P, Giacomini S, Longhi A, et al. 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 Aug;12(8):1145-50.
42. Ferrari S, Briccoli A, Mercuri M, Bertoni F, Cesari M, Longhi A, et al. Late relapse in osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2006 Jul;28(7):418-22.
43. Durnali A, Alkis N, Cangur S, Yukruk FA, Inal A, Tokluoglu S, et al. Prognostic factors for teenage and adult patients with high-grade osteosarcoma: an analysis of 240 patients. *Med Oncol.* 2013;30(3):624.
44. Tomer G, Cohen JJ, Kidron D, Katz K, Yosipovitch Z, Meller I, et al. Prognostic factors in non-metastatic limb osteosarcoma: a 20-year experience of one center. *Int J Oncol.* 1999 Jul;15(1):179-85.
45. Muñoz Villa A, Ocete G, Aymerich ML, Maldonado S, Otheo E, Calvo M, et al. Preoperative and postoperative chemotherapy of osteogenic sarcoma of the limbs in children. *Med Clin (Barc).* 1996 Jun 29;107(5):161-4.
46. Ferrari S, Bacci G, Picci P, Mercuri M, Briccoli A, Pinto D, et al. Long-term follow-up and post-relapse survival in patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol.* 1997 Aug;8(8):765-71.

47. Ilić I, Manojlović S, Cepulić M, Orlić D, Seiwerth S. Osteosarcoma and Ewing's sarcoma in children and adolescents: retrospective clinicopathological study. *Croat Med J.* 2004 Dec;45(6):740-5.
48. Wu PK, Chen WM, Chen CF, Lee OK, Haung CK, Chen TH. Primary osteogenic sarcoma with pulmonary metastasis: clinical results and prognostic factors in 91 patients. *Jpn J Clin Oncol.* 2009 Aug;39(8):514-22.
49. Read JA, Winter VJ, Eszes CM, Sessions RB, Brady RL. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins.* 2001 May 1;43(2):175-85.
50. Kim EE, Wyckoff HW. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *J Mol Biol.* 1991 Mar 20;218(2):449-64.t
51. Bispo Júnior RZ. Fatores prognósticos da sobrevida no osteossarcoma primário: grau I versus II de Huvos [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.
52. Thorpe WP, Reilly JJ, Rosenberg SA. Prognostic significance of alkaline phosphatase measurements in patients with osteogenic sarcoma receiving chemotherapy. *Cancer.* 1979 Jun;43(6):2178-81.

53. Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics*. 2nd ed. Blackwell Science: Massachusetts, 2006 p.502.