

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA**

**DETECCIÓN DE FAS Y DEL FACTOR
DE TRANSCRIPCIÓN YIN- YANG 1 EN
MUESTRAS DE OSTEOSARCOMA DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS**

TESIS

QUE PRESENTA:

**GLENDALISSETTE JUÁREZ CABALLERO
ONCOLOGA PEDIATRA
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS MÉDICAS**

TUTOR:

Dr. Mauricio Salcedo Vargas.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Bienaventurado el hombre que halla la sabiduría y que obtiene la inteligencia; porque su ganancia es mejor que las ganancias de la plata, y sus frutos más que oro fino.

Más preciosa es que las piedras preciosas; y todo lo que puedes desear, no se puede comparar a ello

Largura de días están en su mano derecha

**Sus caminos son caminos deleitosos y todas sus veredas paz.
Ella es árbol de vida a los que de ella echan mano y
bienaventurados son los que la retienen.**

Pr: 3: 131- 8

INDICE:

	PAGINAS
I. AGRADECIMIENTOS.....	2
II. RESUMEN	4-5
III. ABSTRACT	6-7
IV. ANTECEDENTES	8-16
V. JUSTIFICACION.....	16
VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
VII. OBJETIVOS.....	17
VIII. HIPÓTESIS.....	17
IX. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18-21
X. RESULTADOS	21-36
XI. DISCUSION	37-38
XII. CONCLUSION	40
XIII. BIBLIOGRAFIA	41-43

Resumen

Detección de Fas y del Factor de Transcripción YY1 en Muestras de Osteosarcoma de Pacientes Pediátricos.

ANTECEDENTES:

El osteosarcoma es una neoplasia maligna que ocupa el sexto lugar de frecuencia en la población infantil. Hasta el momento se han descrito una serie de factores pronósticos de supervivencia a largo plazo, entre los que destaca la presencia de enfermedad metastásica. Entre los marcadores biológicos descritos como de mayor predisposición a desarrollar metástasis pulmonares se encuentra Fas/Fas ligando. Sin embargo no hay reportes de la condición de los pacientes mexicanos pediátricos. Asimismo se ha destacado la presencia del factor de transcripción YY1 como un marcador de alto grado de malignidad en neoplasias óseas, deseándose explorar su condición en pacientes pediátricos. Finalmente se ha descrito una relación entre YY1 y Fas en otras neoplasias, la cual es necesario explorar en biopsias de osteosarcoma. Dichas biopsias se consideran de difícil obtención en cuanto a calidad y calidad debido al proceso de descalcificación al que deben ser sometidas razón por la cual se debe explorar su viabilidad para estudios de inmunohistoquímica.

OBJETIVOS:

- Determinar la preservación antigénica y posteriormente estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para el factor de transcripción YY1 y Fas en tejido de osteosarcoma de pacientes pediátricos en un microarreglo de tejidos.
- Determinar por medio de un microarreglo si existen diferentes niveles de expresión en las muestras de osteosarcoma de pacientes pediátricos.
- Determinar si se corrobora la relación inversamente proporcional descrita en otras neoplasias entre la expresión de Fas y YY1 en muestras de osteosarcoma de pacientes pediátricos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó una revisión de los archivos de patología, capturando los casos con diagnóstico histopatológico de osteosarcoma. Del expediente clínico se obtuvo la información de edad, sexo, distribución anatómica, determinación de deshidrogenasa láctica, tipo de biopsia, presencia o no de metástasis, sitio de metástasis, esquema de quimioterapia y estado actual. Las laminillas fueron revisadas realizándose al mismo tiempo la selección de la laminilla y bloque mejor preservado, esto es con menos necrosis celular y mayor cantidad de componente tumoral. Se construyó un microarreglo por medio del microarreglador Tissue microarray semiautomatic machine (ATA-100) (Chemicon) Se hicieron cortes para tinción de histoquímica hematoxilina-eosina (H/E), de inmunohistoquímica con vimentina para corroborar la calidad del tejido y finalmente de inmunohistoquímica para YY1 y Fas. Del análisis inmunohistoquímico se realizó un análisis morfométrico con el fin de medir de manera cuantitativa la expresión de proteínas. Para el análisis descriptivo se utilizaron medidas de tendencia central. Los resultados de inmunohistoquímica

se analizaron utilizando el programa de análisis estadístico Prism 4© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. La evaluación de la diferencia en la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas, se realizó mediante ANOVA de una vía. $p \leq 0.05$ considerándose como significativa. Se realizó análisis de correlación para determinar la relación entre Fas y YY1 y análisis de supervivencia.

RESULTADOS: Se analizaron 32 muestras provenientes de 28 pacientes. El grupo de pacientes constaba de 18 mujeres y 10 hombres, la mediana de edad al diagnóstico era de 11 años con un rango de 3 a 15 años. La distribución anatómica del sitio primario fue: 16 en fémur, 5 en tibia, 4 en peroné proximal y 3 en húmero. Al realizar la inmunohistoquímica se logró determinar la presencia de Fas y YY1 tanto en biopsias diagnósticas, en desarticulación postquimioterapia y en metástasis pulmonares. Tanto Fas como YY1 se encuentran expresados en el núcleo como en el citoplasma. La expresión de Fas cuantificada por IOD fue heterogénea con un promedio de 13887.30 (rango de 497.40 - 33266.80). Hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Fas entre las muestras. La expresión de YY1 cuantificada por IOD fue heterogénea con un promedio de 12998.60 (rango 256.81- 41680.60). Hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de YY1 entre las muestras. Al realizar un análisis de correlación se observa una tendencia a una relación inversamente proporcional entre Fas y YY1. En el análisis multivariado la única variable que demostró afectar la supervivencia de los pacientes fue la presencia de metástasis; la cual confiere un riesgo 3 veces mayor de muerte ($p = 0.0028$).

CONCLUSIONES: Se logró detectar Fas y YY1 en las muestras de osteosarcoma utilizando un microarreglo de tejido con diferencias en la intensidad de la expresión lo cual demuestra estas moléculas tienen una participación en el proceso de oncogénesis de osteosarcoma

ABSTRACT

Expression of Fas and YY1 Transcription Factor in Pediatric Osteosarcoma

BACKGROUND:

Osteosarcoma is the sixth most common malignant neoplasia in the pediatric population. The presence of metastasis has been highlighted as one of the prognostic factors for long-term survival. Among the different biological markers related to lung metastasis, Fas/Fas ligand has been considered one of the most important ones; however, no studies have been done on the Mexican population. Furthermore, transcription factor YY1 has also been linked to a high malignancy rate in neoplasias of bone, hence our intention to explore its condition in Mexican pediatric patients. Finally, a relationship between YY1 and Fas has been found in other neoplasias which will be explored in osteosarcoma biopsies. Due to the process of decalcification that bone biopsies endure, good quality biopsies are hard to obtain and thus we should evaluate the viability of these biopsies for immunohistochemistry research.

OBJECTIVES:

- After determining the antigenic preservation, standardization of immunohistochemistry staining of YY1 factor transcription and Fas in the osteosarcoma of pediatric patients included in a tissue microarray.
- Determine if there are different expression levels in osteosarcoma biopsies included in a tissue microarray.
- Determine if the inverse relationship between Fas and YY1, described in other neoplasias, can be found in osteosarcoma.

MATERIAL AND METHODS:

After reviewing pathology archives and clinical charts we obtained age, sex, anatomic site, lactate dehydrogenase level, type of biopsy, detection of metastasis, site of metastasis, chemotherapy and actual condition. After analyzing tissue slides, the best spots with better viable tissue and better preserved (those with less necrosis and most tumoral cells) were selected. The tissue microarray was built through a Tissue microarray semiautomatic machine (ATA-100) (Chemicon). After hematoxyline-eosine and vimentine stains were used to verify tissue quality, YY1 and Fas stains were performed. In order to quantitatively evaluate protein expression, an immunochemistry analysis was implemented. Descriptive statistics were obtained by means of central tendency measures. Immunochemistry results were analyzed using Prism 4© of GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Mean differences of the density expression of the immunochemistry reactions were analyzed using one-way ANOVA, *p-values* ≤ 0.05 were considered statistically significant. Also, a correlation analysis was performed to determine if there was a linear relationship between Fas and YY1; finally a survival analysis was fit to the collected data.

RESULTS:

We analyzed 32 samples from 28 patients. The data consisted of 18 females and 10 men; age median at diagnosis was 11 years (3-15 yrs). Primary bone

distribution was: 16 in femur, 5 in tibia, 4 in proximal fibula and 3 in humerus. Immunohistochemistry was able to detect Fas and YY1 in diagnostic biopsies, post chemotherapy disarticulation and lung metastasis. Both are expressed in nucleus and cytoplasm. Fas expression quantified by IOD was heterogeneous with an average of 13887.30 (497.40- 33266.80); there were statistically significant differences among the different samples. YY1 expression quantified by IOD was heterogeneous with an average of 12998.60 (256.81- 41680.60); there were statistically important differences among the different samples. Correlation analysis between Fas and YY1 showed a tendency to an inverse linear relationship. Multivariate survival analysis showed that the only variable that was related with survival was presence of metastasis conferring 3 times more risk of death ((p= 0.0028).

CONCLUSIONS:

We were able to detect Fas and YY1 in osteosarcoma samples using a tissue microarray with statistically significant differences among the samples. This shows these molecules are involved in the oncogenic process of osteosarcoma

I. ANTECEDENTES

1. Osteosarcoma

El osteosarcoma es un tumor maligno primario de hueso, que deriva del mesénquima primitivo formador de hueso y se caracteriza por la producción de tejido osteoide maligno y de hueso inmaduro a partir de células del estroma inmaduro¹.

Los tumores óseos representan la sexta neoplasia más frecuente en niños. En adolescentes y adultos jóvenes son la tercera neoplasia más frecuente, superada por leucemias y linfomas. En EUA se reportan 8.7 casos por millón en niños y adolescentes menores de 20 años. La incidencia en menores de 5 años es menor a 1 por millón, en el grupo de 5 a 9 años es de 2 por millón, en el grupo de 10 a 14 años es de 7 por millón y el pico se presenta en el grupo de 15 a 19 años con 8 a 11 por millón.²

En México los registros llevados a cabo con población derechohabiente del Instituto Mexicano del Seguro Social reportan una incidencia que oscila de 6.4 por millón a 15.9 por millón en pacientes menores de 14 años, dependiendo del estado que aporte los datos. En relación con los subtipos específicos, México tiene un comportamiento muy similar al internacional siendo el osteosarcoma el principal tumor óseo, representando el 50 a 60% de casos.³

1 a. Hallazgos Histopatológicos

El diagnóstico de osteosarcoma se basa en criterios histopatológicos y su correlación con la imagen radiográfica correspondiente.

El diagnóstico histológico del osteosarcoma depende de la presencia de estroma sarcomatoso francamente maligno asociado a la producción de osteoide maligno. Existe gran variabilidad en el patrón histológico de este tumor y en el grado de producción de osteoide.

Actualmente existen diversos tipos de osteosarcoma, siendo clasificados basados en: la localización de la lesión, el tipo de hueso relacionado (por ejemplo los huesos gnáticos) o si están relacionados con alguna enfermedad¹.

TIPOS DE OSTEOSARCOMA
Osteosarcoma Convencional (intramedular)
Osteoblástico
Condroblástico
Fibroblástico
Epiteloide
Rico en Células Gigantes
Células Pequeñas
Telangiectásico
Osteosarcoma asociado a la corteza
Parosteal
Parosteal desdiferenciado
Periosteal
Superficial de alto grado
Intracortical.
Osteosarcoma central de bajo grado
Osteosarcoma similar a osteoblastoma
Osteosarcoma asociado a enfermedades
Osteosarcoma en Enfermedad Paget
Osteosarcoma en Displasia Fibrosa
Osteosarcoma en enfermedad Mazabraud
Osteosarcoma Multicéntrico
Osteosarcoma Postirradiación
Osteosarcoma de hueso gnáticos

El grupo más grande de osteosarcomas corresponde al osteosarcoma convencional, el cual se observa predominantemente en niños y adolescentes. En el osteosarcoma convencional, el estroma de tejido conectivo aparece como una mezcla de células largas, atípicas en forma de huso que son de alto grado de malignidad, con un núcleo grande e irregular y con figuras mitóticas anormales. El estroma puede lucir muy anaplásico. Entremezcladas con el estroma pleomórfico hay áreas de producción de osteoide maligno y de calcificación irregular íntimamente asociadas con las células malignas.

Dahlin y Coventry clasificaron al osteosarcoma convencional en tres categorías basadas en la diferenciación de las células tumorales. Aproximadamente 50% de los casos de osteosarcoma se caracterizan por abundante producción de osteoide y esta categoría corresponde al osteosarcoma osteoblástico. En alrededor de 25% de los casos la diferenciación predominante es de tipo cartilaginosa (osteosarcoma condroblástico), cabe señalar que lograr distinguir estos tumores de los condrosarcomas puros puede ser difícil, sobre todo cuando la producción de osteoide es mínima. La última categoría, el fibroblástico se caracteriza por un estroma con células en forma de huso, con un patrón que recuerda al fibrosarcoma, pero aunque en cantidades mínimas, ostenta osteoide maligno⁴. El valor de esta subclasificación no está bien establecido. Hasta el momento, no se han observado diferencias significativas en el comportamiento o pronóstico de cada una de las subclases.

El osteosarcoma telangiectásico es una variedad inusual (aproximadamente 3% de todos los casos de osteosarcoma) y se caracteriza por asemejar una lesión lítica pura en las radiografías con poca calcificación o formación de hueso. Estos tumores son quísticos e histológicamente se observan espacios vasculares dilatados, llenos de sangre y tejido necrótico. El tejido tumoral viable se confina a la periferia de la lesión.

Previo a la institución de la quimioterapia neoadyuvante, el pronóstico del osteosarcoma telangiectásico era estadísticamente peor que el del osteosarcoma

convencional. Sin embargo con el advenimiento de la quimioterapia, el pronóstico del osteosarcoma telangiectásico es igual o incluso mejor que el asociado con los tipos convencionales de osteosarcoma¹.

1. b. Presentación clínica.

El dolor en el área afectada es por lo general el síntoma inicial más frecuente; este se puede acompañar o no de aumento de volumen en el área y ocasionalmente de limitaciones en la movilidad de la articulación adyacente. El tiempo promedio de duración de los síntomas es de 3 meses; sin embargo una historia de hasta 6 meses no es rara.

El osteosarcoma afecta principalmente a los huesos largos tubulares, especialmente los adyacentes a la rótula. El fémur distal y la tibia proximal son los sitios de involucro más frecuentes, seguidos en frecuencia por el húmero proximal y el fémur proximal y distal.

Aproximadamente 15 a 20% de los pacientes se presentan con enfermedad macrometastásica visible al momento del diagnóstico. La mayoría de las lesiones metastásicas se encuentran en los pulmones; sin embargo una pequeña fracción de los pacientes se presenta con metástasis óseas con o sin metástasis pulmonares concomitantes. La presentación con múltiples metástasis óseas puede reflejar un tumor primario multifocal y este hecho le otorga un muy mal pronóstico⁵⁻⁷.

Familia de Sarcomas Osteogénicos				
Tumor	Edad de Inicio	Sitios primarios comunes	Rasgos distintivos	Curso clínico
Fibrosarcoma	De la segunda a sexta década	Similar a osteosarcoma	Células en huso y colágeno pero sin osteoide	Similar al osteosarcoma
Condrosarcoma	Tercera a séptima década	Principalmente en tronco y extremidades proximales	Larga historia de síntomas, el tejido proliferativo es cartilago sin tumor osteoide	Rara vez hay metástasis que aparecen años después.
Osteosarcoma Convencional Condrolástico Fibrolástico	Segunda y tercera década.	Alrededor de la articulación de la rodilla y el hombro	Presencia de tumor osteoide; grados variables de diferenciación osteoblástica, condrolástica y fibrolástica.	Diseminación temprana a pulmones y/ o esqueleto.
Telangiectásico	Segunda y tercera década	Similar al osteosarcoma convencional	Quístico, tumor lleno de sangre	Similar a osteosarcoma convencional
Células pequeñas	Segunda y tercera década	Similar al osteosarcoma convencional	Se puede confundir con sarcoma de Ewing	Similar al osteosarcoma convencional; responde a radioterapia
Multifocal	De la segunda a sexta década	Involucramiento sincrónico de múltiples huesos	¿Múltiples tumores primarios vs tumor primario metastásico?	Uniformemente fatal
Parosteal (osteosarcoma yuxtacortical)	A partir tercera década	Región posterior de fémur distal	Surge de la corteza; rodea hueso involucrado; gran osificación.	Curso indolente con tendencia baja a metástasis
Periosteal (condrosarcoma yuxtacortical)	De la quinta a séptima década	Tibia y fémur	Tumor limitado a la periferia de la corteza	Pronóstico intermedio

1c. Factores Pronósticos

Hasta la fecha se han determinado diversas características clínicas relacionadas con el pronóstico de los pacientes. Los factores clínicos tradicionales que influyen el pronóstico se han relacionado principalmente con la edad del paciente, el sitio de presentación y el tamaño tumoral; la extensión de la invasión y más específicamente la etapa del tumor también han demostrado un valor pronóstico y finalmente la respuesta a la quimioterapia prequirúrgica.⁸

En relación con los diferentes grupos de edad, se muestra una tendencia relacionada a un pronóstico más desfavorable para los pacientes menores de 10 años y para los mayores de 40 años.⁸

El sitio primario de la enfermedad también es una variable importante. Una revisión de la literatura sobre la supervivencia en grandes series sugiere que los pacientes con tumores primarios en esqueleto axial tienen un pobre pronóstico. Además se han observado diferencias en la supervivencia a cinco años en aquellos pacientes con localización en tibia proximal con 77.5% comparada con el 66% de la presentación en fémur distal.⁸

El tamaño tumoral también se ha considerado un importante factor pronóstico. La extensión intramedular del tumor (evaluado por TAC) también se correlaciona con el riesgo de desarrollar enfermedad metastásica. La presencia de metástasis saltatorias, a pesar de no ser frecuentes, son un dato de mal pronóstico^{4,9}.

La etapa clínica de la enfermedad es predictiva del pronóstico razón por la cual es la base para la selección de la cirugía que debe ser empleada. La quimioterapia agresiva ha mejorado la supervivencia de los pacientes sin enfermedad metastásica durante las últimas dos décadas logrando supervivencias libre de evento de acerca al 70%¹⁰⁻¹³. Por otro lado la presencia de enfermedad metastásica detectable por radiografías al momento del diagnóstico confiere un peor pronóstico para la supervivencia.

En los pacientes con osteosarcoma metastásico al momento del diagnóstico, la supervivencia a cinco años es menor al 20%^{9, 14-18}. Sin embargo, los pacientes con osteosarcoma metastásico primario son un grupo heterogéneo, con una supervivencia a 5 años de hasta 75% en pacientes con enfermedad metastásica pulmonar unilateral, mientras que la diseminación ósea presentan resultados catastróficos¹⁹. Por lo tanto, es necesario contar con un criterio de estratificación más confiable. Los últimos reportes mencionan una supervivencia a 5 años del 29% y los dos factores pronósticos para la supervivencia fueron: la presencia de múltiples metástasis y resección macroscópica incompleta. En este grupo es de suma importancia desarrollar nuevas estrategias terapéuticas debido a su pobre pronóstico.

El último factor estudiado es el porcentaje de necrosis del tumor posterior a la administración de la quimioterapia; siendo éste posterior a la revisión de la literatura, el factor más significativo que se relaciona con la supervivencia libre de enfermedad.

Un sistema de clasificación muy utilizado para valorar respuesta a quimioterapia es el porcentaje de tejido necrótico posterior a la quimioterapia de inducción clasificada de acuerdo con el sistema de Huvos. Los pacientes con < 90% de necrosis se clasifican como malos respondedores o Huvos grado I/II. A pesar de la mejora en los protocolos no ha habido una mejoría en la supervivencia libre de enfermedad en el grupo de los malos respondedores²⁰. Esto sugiere que debe haber algunas diferencias biológicas innatas entre los tumores que responden y los que no²¹⁻²².

Grado Huvos	Porcentaje de necrosis (%)	Efecto histológico
I	0-50	Poco o ningún efecto identificado
II	51-90	Áreas de tumor osteoide acelular, necrótico o material fibrótico atribuible al efecto de la quimioterapia, con otras áreas de tumor viable
III	91-99	Áreas predominantes de osteoide acelular, necrótico o material fibrótico atribuible al efecto de la quimioterapia, con focos dispersos de células tumorales viables
IV	100	Sin datos histológicos de tumor viable identificable en todo el espécimen

Es importante mencionar que la mejoría en la supervivencia asociada al inicio de la quimioterapia se ha documentado en protocolos realizados en centros de Norteamérica y Europa logrando una supervivencia de hasta 75%; no obstante los pacientes que se ubican en países en vías de desarrollo no han logrado esta supervivencia. Actualmente hay poca información sobre las características y el tratamiento en esta población. En un estudio realizado en población brasileña se observó que la supervivencia libre de evento sin enfermedad metastásica es de 45.5%. Se detectó un patrón de enfermedad avanzada al tiempo del diagnóstico con una alta proporción de pacientes con metástasis (20.8%) que es mayor que la reportada en otros estudios^{2, 14, 17} y un gran tamaño tumoral (42.9%). En este estudio no se documentó si la tardanza en establecer el diagnóstico jugaba un papel determinante en las características de presentación clínica. Lo que llamó la atención, es que el tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y el diagnóstico no se correlacionó con la presencia de metástasis, tamaño tumoral o supervivencia. Esta información sugiere que la etapa de la enfermedad depende más de factores biológicos del tumor que de un diagnóstico tardío²³.

En México, según estudios realizados en el Instituto Nacional de Pediatría, el porcentaje de pacientes con enfermedad metastásica es de 31% de los casos con una supervivencia del 34% para este grupo. Además, se reporta una supervivencia en los pacientes no metastásicos del 48% a pesar de utilizar los mismos esquemas de quimioterapia utilizados en los protocolos de primer mundo²⁴.

Con el advenimiento de la biología molecular se iniciaron diversos estudios citogenéticos y de biología molecular los cuales han arrojado resultados variados y ocasionalmente contradictorios. Entre las dificultades técnicas que se han enfrentado este tipo de estudios se encuentran: el proceso de descalcificación a la cual deben ser sometidas todas las muestras para su estudio; la necrosis posterior a la quimioterapia preoperatoria que es parte del protocolo de tratamiento de estos pacientes con la consecuente dificultad de obtener tejido neoplásico viable y

finalmente la rareza de esta neoplasia lo cual dificulta la obtención de gran número de pacientes para estudiar. Sin embargo, hasta el momento se ha logrado un gran progreso para contribuir al conocimiento tanto de la etiología de este tumor como a la identificación de potenciales blancos de biomarcadores pronósticos o terapéuticos.²⁵

El estudio de genes específicos asociados al desarrollo de osteosarcoma surgió de hallazgos citogenéticos previos así como de enfermedades asociadas con osteosarcoma. Aunque no necesariamente específicos de osteosarcoma, se han logrado identificar cierto número de genes; entre los cuales se encuentran genes supresores de tumores, oncogenes y genes que codifican para factores de crecimiento. Algunas de las anormalidades detectadas se han identificado en otros sarcomas así como en algunos carcinomas. La importancia relativa de varios de estos factores en el proceso de tumorigénesis es aún incierta, aunque la relación entre un perfil de expresión genética y el pronóstico y respuesta a quimioterapia se hace más evidente.²⁵

Un estudio piloto utilizando microarreglos de DNA que analizó tumores óseos (osteosarcoma y tumor de Ewing) demostró un perfil de genes específicos relacionados con el tumor de Ewing y con un mayor número de genes relacionados con osteosarcoma. Entre las muestras de osteosarcoma se observó una variabilidad significativa; sin embargo en los casos que se comparó el tumor primario con la metástasis hubo semejanzas muy notorias. Actualmente se han continuado los estudios en la búsqueda de genes que se supriman o se activen durante el proceso de metástasis.²²

2. El papel de Fas- Fas ligando.

La apoptosis es un mecanismo controlado genéticamente que juega un papel importante en la regulación de la progresión tumoral y la presencia de metástasis. El crecimiento del tumor depende no solo de una proliferación no controlada sino también de la supresión de la apoptosis.²⁶

Se conocen diversos factores que llevan a la inducción de la apoptosis; entre los que se encuentran la estimulación de los receptores de muerte en la membrana de la célula, tales como Fas- Fas ligando.

Fas ligando (FasL) es una proteína transmembranal de 40 kilodaltones (Kd) que se clasifica como una proteína tipo II de la familia TNF. FasL induce la apoptosis en células susceptibles a partir de su unión con su receptor Fas. En general FasL se expresa en linfocitos T. A pesar del hecho de que FasL se expresa en órganos específicos, tales como testículo y ojos, la sobreexpresión de FasL se encuentra en diferentes tumores incluyendo, melanoma, linfoma, carcinoma esofágico, carcinoma gástrico y carcinoma de colon²⁶. A la fecha se desconoce la expresión de esta proteína en osteosarcoma.

Fas es una glicoproteína de 45 Kd que se identificó por primera vez utilizando anticuerpos que inducía la muerte rápida de las células tumorales a partir de la unión con su ligando natural FasL. Fas se expresa en muchos tejidos, con una preponderancia en el timo, pulmón, corazón y riñón.

La apoptosis mediada por Fas esta desencadenada por FasL. El mecanismo a partir del cual se regula la apoptosis es el siguiente: Después de la unión de FasL, a Fas; este último se asocia con dos proteínas específicas: dominio de muerte asociado a Fas(FADD) y caspasa 8, se forma el complejo de señalización de inductor de muerte (DISC). FADD recluta la proteasa de cisteína caspasa-8, que activan directa o indirectamente a otros miembros de la familia de caspasa, lo cual resulta en la destrucción de proteínas celulares y la apoptosis subsiguiente.

Se sabe que el tejido pulmonar por lo general expresa constitutivamente FasL, el cual puede inducir la muerte celular en células que expresan Fas. Específicamente, la disminución de Fas puede prevenir la eliminación de células tumorales a partir de la vía Fas/FasL.²⁷⁻²⁸

El grupo de Lafleur ha estudiado en modelos animales la expresión de Fas en una línea celular de osteosarcoma con un potencial altamente metastásico (SAOS-LM7), demostrando que la expresión de Fas se relaciona inversamente con el potencial metastásico²⁹, sugiriendo que el aumento en la expresión de Fas permite a las células ser susceptibles a apoptosis.

El grupo de Kleinerman analizó por inmunohistoquímica 38 biopsias de metástasis pulmonares de pacientes con osteosarcoma, observando que 23 de los nódulos pulmonares eran negativos a Fas, 12 eran ligeramente positivos y 1 era positivo. Lo cual sugiere que la pérdida de Fas es un mecanismo por el cual las células de osteosarcoma evaden los mecanismos de resistencia pulmonar.

En estudios posteriores Kleinerman y colaboradores demostraron que la expresión aumentada por parte de la célula de Fas se relaciona con un bajo potencial metastásico; mientras que la baja expresión de Fas favorecerá la presencia de metástasis. Además en modelos animales lograron determinar que la inhibición de la señalización de Fas en el tumor o bien la falta de FasL en el ambiente del huésped permite la proliferación de células Fas positivas en el pulmón y favorece la promoción del crecimiento metastásico.³⁰

3. El factor de transcripción YIN-YANG 1 (YY1)

El factor de transcripción Yin Yang 1 se conoce por desempeñar funciones fundamentales en los procesos normales del desarrollo tales como embriogénesis, diferenciación, replicación y proliferación celular. YY1 ejerce sus efectos genéticos a través de su habilidad para iniciar, activar o reprimir la transcripción dependiendo del contexto en el cual se realiza su unión^{23, 31-33}.

Sus mecanismos de acción incluyen la activación o represión directa, la activación o represión indirecta vía un cofactor de reclutamiento o bien la activación o represión por alteración del sitio de unión o cambios conformacionales del DNA. La actividad de YY1 está regulada por factores de transcripción y proteínas citoplasmáticas.

Promotores de Genes Humanos que regula YY1	
Promotor/producto génico	Actividad en YY1
<i>Dependientes de Inhibidores de histonas deacetilasas</i>	
HD1 Inhibidores de Histonas Deacetilasas Humana homóloga del gen de la levadura RDP3	Represión
Complejo HDAC-1.-2	Represión vía unión a YY1 en su dominio rico en glicina
HDAC-3	Represión vía asociación al complejo; interacción con receptores nucleares de hormona; remodelación de cromatina.
HDAC-3	Represión independiente del complejo.
<i>Independientes de Inhibidores de histonas deacetilasas</i>	
GATA-1	Corepresión del gen de ϵ -globina
Nucleofosmina (Fosfoproteína nuclear)	Represión
PARP-1	Represión y silenciamiento transcripcional durante el daño a DNA aumentado
Smad-1,-2,-4	Corepresión de la transición inducida por TGF- β de epitelio a mesénquima
<i>Dependientes de acetiltransferasa de histonas</i>	
CBP	Se requiere para activar los promotores de proteínas elementos de unión de respuesta a AMP cíclico (CREB) a partir de la modificación de histonas
P300	Requerido para la activación de la oncoproteína E1A a partir de la modificación de histonas
<i>Independientes de acetiltransferasa de histonas</i>	
Proteína nucleolar B23	Liberación de la represión
BrdU	Activación e incremento de la expresión de YY1
Proteína C/EBP b	Coactivación del promotor de HPV-18
Oncoproteína E1A	Trans-activación (conversión de represor a activador)
MGF (Factor específico de glándula mamaria)	Liberación de la represión (solo durante la lactancia)
NF- $\kappa\beta$	Liberación de la represión
TBP (Proteína de unión TATA); TAF (Factor asociado a TBP)	Coactivación via interacción con el dominio de activación ácido
YY1AP (HCCA2)	Coactivación

Existen diversos mecanismos moleculares bajo investigación con el fin de explicar los efectos de YY1, entre los que destacan: disminución de la actividad de p53 mediada por YY1, interferencia con la polimerasa poli-ADP, ribosa, alteración en la expresión de c-myc, regulación de genes de muerte y diferencias en la unión de YY1 en presencia de mediadores de la información. Estudios más recientes, han implicado a YY1 en mecanismos que regulan la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia. Tomando en cuenta toda la información, se está considerando que YY1 además de sus funciones reguladores en los procesos biológicos normales, también juega un papel como iniciador de carcinogénesis y por lo tanto puede ser utilizado como un marcador diagnóstico y pronóstico de dichas neoplasias³¹.

Datos recientes de Huerta y cols demostraron que YY1 reprime la transcripción del gen Fas uniéndose a su promotor³¹. El tratamiento de líneas celulares tumorales con un donador de óxido nítrico induce una sobreexpresión de Fas, ya que el óxido nítrico inactiva al factor de transcripción YY1 que funciona como represor de Fas³¹. La manera en que el óxido nítrico inactiva a YY1 es mediante S-nitrosilación de los dedos de Zinc de esta proteína y la subsiguiente inhibición de la actividad de unión al DNA³². La sobreexpresión de Fas, induce la sensibilización de líneas celulares tumorales a la apoptosis mediada por este receptor. Otros trabajos en líneas celulares de cáncer de próstata y de ovario demostraron que YY1 regula también de forma negativa la expresión de DR5, estos resultados fueron obtenidos mediante estudios de promotor clonados en plásmidos reporteros, ensayos con RNA de interferencia e inmunoprecipitación de la cromatina³⁴⁻³⁵. Por otro lado, se afirmó que líneas celulares de cáncer de

próstata refractarias a tratamiento poseen mayor actividad de YY1 que las células epiteliales normales de próstata, hecho corroborado en un estudio de microarreglo de tejidos utilizando más de 250 pacientes con cáncer de próstata con diferente grado de malignidad³⁶. Dichos estudios sugieren que la sobreactivación de YY1 probablemente sea un mecanismo de resistencia a la apoptosis desarrollada por las células tumorales, ya que puede inducir que la expresión de DR5 disminuya, lo cual a su vez causa que las células sean resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL.

El grupo de De Nigris³⁷ demostró la presencia de YY1 asociado con líneas celulares de osteosarcoma. Posteriormente analizando 10 muestras de osteosarcoma comparados con 10 muestras de tejido sano, observaron que todos los casos de osteosarcoma fueron positivos para YY1, con tinción tanto en núcleo como en citoplasma.

Este mismo grupo utilizando RT-PCR determinó una presencia aumentada del RNA mensajero en las muestras provenientes de osteosarcoma comparadas con el tejido sano; además de 3 muestras provenientes de metástasis pulmonares se encontró un aumento hasta 12 veces más comparado con tejido sano³⁷.

En estudios posteriores se demostró que la delección de YY1 induce un decremento significativo de la invasión celular y crecimiento de metástasis. Este fenómeno se asocia con una disminución en el factor de crecimiento endotelial y por lo tanto de la angiogénesis³⁸.

Estos datos sugieren que la activación de YY1 tiene un factor en la carcinogénesis temprana en osteosarcoma. Asimismo no hay datos hasta la fecha que relacionen la expresión de YY1 con el proceso metastásico.

II. JUSTIFICACIÓN

El osteosarcoma es una neoplasia ósea maligna que ocupa el primer lugar dentro de las neoplasias que afectan al hueso. Se considera entre las 6ta y 8va neoplasia más frecuente en la población pediátrica y de adolescentes. En nuestro país, el Hospital Infantil de México recibe de 10 a 12 pacientes al año con esta neoplasia; con el fin de aumentar el número de pacientes a estudiar es necesario recurrir a los archivos de patología. Debido al proceso de descalcificación al cual debe ser sometida dicha muestra es necesario valorar la preservación antigénica y factibilidad de lograr un microarreglo de tejidos de muestras de osteosarcoma (tanto en biopsia diagnóstica, desarticulación y metástasis pulmonares).

El estudio de características moleculares ya descritas en la literatura, relacionadas con mayor agresividad tumoral y presencia de metástasis en las muestras de nuestros pacientes pediátricos podría tener un serio impacto tanto en el conocimiento básico de la enfermedad, como en el descubrimiento de nuevos valores pronóstico.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El osteosarcoma es una neoplasia ósea maligna cuyo factor pronóstico más importante es el volumen de la enfermedad, hasta el momento los casos metastásicos al momento del diagnóstico se han visto poco favorecidos con los avances en las diferentes modalidades terapéuticas. Hoy día la supervivencia de estos pacientes no sobrepasa el 30%. La dificultad para la obtención de muestras y el proceso de descalcificación de las mismas para su análisis diagnóstico, han limitado el número de reportes de esta neoplasia, que permitan conocer el comportamiento y fisiopatogenia de la misma. Se desconoce hasta el momento si la expresión de estas dos moléculas potencialmente marcadores, puede ser detectada en muestras descalcificadas e incluidas en parafina obtenidas del archivo del Hospital Infantil de México Federico Gómez y en caso de detectarse si pueden proveer información sobre el proceso de metástasis. Por lo tanto se plantean las siguientes:

IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Se podrá evaluar la expresión de Fas y YY1 en muestras de osteosarcoma de pacientes pediátricos por medio de la técnica de inmunohistoquímica en un microarreglo de tejidos?
2. ¿Habrá diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Fas y YY1 entre las muestras obtenidas de biopsias diagnósticas y metástasis?
3. ¿Se podrá determinar si existe alguna relación entre la expresión de Fas y YY1 en muestras de osteosarcoma de pacientes pediátricos?

V. OBJETIVOS

- Determinar la preservación antigénica y posteriormente estandarizar la técnica de inmunohistoquímica para el factor de transcripción YY1 y Fas en tejido de osteosarcoma de pacientes pediátricos en un microarreglo de tejidos.
- Determinar si existen diferentes niveles de expresión en las muestras de osteosarcoma de pacientes pediátricos por medio de un microarreglo.
- Determinar si se corrobora la relación inversamente proporcional descrita en otras neoplasias entre la expresión de Fas y YY1 en muestras de osteosarcoma de pacientes pediátricos.

VI. HIPÓTESIS

- La técnica de microarreglo de tejidos podrá detectar la expresión de YY1 y de Fas en muestras de osteosarcoma de pacientes pediátricos.
- Los niveles de expresión cuantificados por IOD serán diferentes en las muestras de osteosarcoma de pacientes pediátricos.
- El nivel de expresión de Fas tendrá una relación inversa con el nivel de expresión de YY1.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio:
Estudio transversal

Fuentes para la obtención de pacientes:
Todas las muestras biológicas para este estudio se obtendrán del servicio de Patología Pediátrica del Hospital Infantil de México; los datos clínicos se obtendrán de los expedientes clínicos del archivo clínico.

Tamaño de la muestra:
Por conveniencia, consistió en todos los bloques de parafina que cubrieron criterios de inclusión de pacientes con diagnóstico de osteosarcoma atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez en los últimos 10 años.

Criterios de inclusión:
Bloque de parafina con suficiente tejido de pacientes diagnosticados con osteosarcoma en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Criterios eliminación:
Especimen que posterior al procesamiento de inmunohistoquímica sea negativo a vimentina, indicándonos mala preservación del tejido.

VII. A Descripción del procedimiento

vii. 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

A través de un estudio descriptivo, transversal se realizó una revisión de los archivos de patología, capturando los casos con diagnóstico histopatológico de osteosarcoma. Del expediente clínico se obtuvo la información de edad, sexo, distribución anatómica, determinación de deshidrogenasa láctica, determinación fosfatasa alcalina, tipo de biopsia, presencia o no de metástasis, sitio de metástasis, tiempo al diagnóstico, esquema de quimioterapia, complicaciones durante el tratamiento y estado actual.

Se recolectaron las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina y los bloques de parafina con suficiente tejido para la elaboración del microarreglo. Las laminillas fueron nuevamente revisadas realizándose al mismo tiempo la selección de la laminilla y bloque mejor preservados, esto es con menos necrosis celular y mayor cantidad de componente tumoral.

Construcción de microarreglos de tejidos

Para la construcción de microarreglos de tejidos, se utilizó el espécimen incluido en parafina. La selección de la zona de interés de cada tejido se llevó a cabo en las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina de cada paciente. La laminilla se colocó en el equipo "tissue microarray semiautomatic machine" (ATA-100) (Chemicon), donde se hizo coincidir el

bloque correspondiente (donador), con la aguja colectora; se hizo un trepano de 6 mm en dicho bloque para la extracción del tejido de interés para implantarlo en un bloque de parafina en blanco (receptor) previamente mapeado.

De los microarreglos se hicieron cortes de 4 μ en microtomo utilizando un sistema en "paraffin tape-transfer system adhesive coated slides" (Instrumedics Inc.), como se describe a continuación: primero, se colocó el bloque en el microtomo, se adhirió la cinta adhesiva sobre la superficie del bloque para cortar con una cuchilla; segundo, se hace el corte por atrás de la cinta; tercero, el corte se colocó sobre la laminilla adecuada; cuarto, se desprendió la cinta con un solvente especial; quinto, se expuso a luz ultravioleta por 1 minuto. Posteriormente las laminillas se almacenaron a 4°C, protegidas de la luz³⁹.

Inmunohistoquímica

Con la finalidad de mantener las condiciones óptimas de inmunodetección entre experimentos, la reacción para cada marcador en los microarreglos, se realizó en un solo tiempo para todos los grupos. Los cortes se mantuvieron a 62°C toda la noche, después se inició el proceso de desparafinado en un primer baño de xilol durante toda la noche, se continuó con el siguiente procedimiento: 3 baños en xileno, 2 baños en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno de ellos con duración de 8 minutos.

Ya con el tejido deshidratado se procedió a la recuperación del antígeno sumergiendo en citrato de sodio (0.01 M pH 6.0) y calentando a ebullición en baño maría por 20 minutos. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 45 minutos. Se bloqueó la unión inespecífica de los anticuerpos al tejido, mediante el uso de suero normal de cerdo al 2% en PBS 1X.

Posteriormente, las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal anti-YY1 o con el anticuerpo monoclonal anti-Fas. Para llevar a cabo la reacción de inmunohistoquímica, se utilizaron los anticuerpos de las casas comerciales Santa Cruz Biotechnology, y Chemicon Co., USA. Después de lavar las secciones de tejido, se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a biotina y posteriormente con streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano HPR (horseradishperoxidase); por último el color se generó mediante la adición del substrato, diaminobenzidina (DAB) de 5 a 10 minutos; la reacción se detuvo con agua de la llave y el tejido fue contrateñido con hematoxilina de Harris por 30 seg⁴⁰.

Con el fin de valorar la preservación antigénica asociada a la pérdida de material por el proceso de descalcificación con ácido nítrico se utilizó para la detección por inmunohistoquímica de vimentina, una proteína sensible a la fijación que típicamente se expresa en componentes vasculares o de

tejido conectivo, y es útil como indicador interno de la conservación o pérdida de la antigenicidad⁴¹.

Finalmente el tejido fue deshidratado bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno, con baños de 5 minutos cada uno. Las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Análisis morfológico

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas para la expresión de YY1 (citoplasma y/o núcleo) y Fas (citoplasma o membrana celular) y la densidad de la expresión (en pixeles) se cuantificaron en cada "spot", utilizando un analizador de imágenes con el programa Imagen-Pro® Plus de Media cybernetics®, Silver Spring, MD. USA. Se tienen 3 spots por cada tejido problema.

vii.2. Definición operativa de variables

1. Factor de transcripción Yin-Yang 1 (YY1)

Definición conceptual – factor de transcripción con dedos de zinc de 414 aa con peso molecular de 68 kDa. Regula la transcripción en diversos genes celulares y virales, mediante tres vías diferentes: reprime, activa, e inicia la transcripción. Reprime la transcripción del gen Fas uniéndose a la región silenciadora de su promotor.

Definición operacional – La positividad se evaluó por el color café nuclear en microarreglos de tejidos de osteosarcoma, en cortes de 4 micras de espesor para su manejo con soluciones químicas y con tinciones de inmunohistoquímica.

Escala de Medición: Cuantitativa continúa.

Unidad de medición: pixeles por micra cuadrada – $\text{pix}/\mu\text{m}^2$.

2. Fas

Definición conceptual - Es una glicoproteína transmembrana tipo I de 45 kD. A través de la unión con Fas ligando. Fas unido a las proteínas: dominio de muerte asociado a Fas(FADD) y caspasa 8 forma el complejo de señalización para inducción de la muerte.

Definición operacional. La positividad se evaluó por el color café nuclear en microarreglos de tejidos de osteosarcoma, en cortes de 3 mm de espesor para su manejo con soluciones químicas y con tinciones de inmunohistoquímica.

Escala de Medición: Cuantitativa continúa.

Unidad de medición: pixeles por micra cuadrada – $\text{pix}/\mu\text{m}^2$.

vii .3.Análisis estadístico

Para el análisis descriptivo se utilizaron medidas de tendencia central.

Para resultados de inmunohistoquímica en microarreglo de tejidos, se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa de análisis estadístico Prism 4© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA. Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas, se realizó mediante ANOVA de una vía; considerándose como significativa cuando $p \leq 0.05$.

Se realizó análisis de correlación para determinar si existe una relación lineal entre Fas y YY1.

Se estimó la función de supervivencia mediante el estimador Kaplan-Meier. Además, se ajustaron modelos de riesgos proporcionales (Cox) para encontrar las covariables significativas.

VIII. RESULTADOS

Se revisaron 54 expedientes de pacientes con diagnóstico de osteosarcoma de acuerdo al registro del departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez; en conjunto con el patólogo se seleccionaron los bloques con suficiente cantidad de tejido para estudio; de dicha selección se obtuvieron 28 casos. El grupo de pacientes constaba de 18 mujeres y 10 hombres, la mediana de edad al diagnóstico era de 11 años con un rango de 3 a 15 años. La distribución anatómica del sitio primario fue: 16 en fémur, 5 en tibia, 4 en peroné proximal y 3 en húmero. La mediana del tiempo de presentación de síntomas previo al diagnóstico fue de 2 meses con un rango de 1 a 8 meses. El promedio de la determinación de fosfatasa alcalina al diagnóstico fue de 573.28 con un rango de 116 a 3103. El promedio de la determinación de deshidrogenasa láctica fue de 403.14 con un rango de 136 a 1450.

La biopsia diagnóstica fue percutánea en el 92% (26 casos) y en 8% de los casos (2) fue a cielo abierto.

En cuanto a la quimioterapia, los esquemas utilizados fueron: cisplatino-adriamicina (2 casos); cisplatino, adriamicina, etopósido e ifosfamida (7 casos); cisplatino, adriamicina, etopósido, ifosfamida y metotrexate (5 casos); cisplatino arterial (14 casos). Las complicaciones durante el tratamiento se catalogaron en infecciosas (3 casos), quirúrgicas (3 casos), metabólicas (2 casos), con más de una complicación de las anteriormente comentadas más complicaciones

hematológicas (6 casos), con más de dos complicaciones (7 casos); el resto de los casos no presentaron complicaciones de acuerdo al expediente clínico.

Posterior a 4 ciclos de quimioterapia se obtuvo el porcentaje de necrosis en 20 casos con un promedio de porcentaje de necrosis de 62.85% rango de (15 a 100%). En 8 pacientes no se obtuvo el porcentaje de necrosis debido a que: 1 paciente estaba en tratamiento al momento de la recolección de datos, 4 pacientes abandonaron tratamiento, 1 paciente fue tratado en otro hospital y 1 paciente falleció por complicaciones infecciosas.

De los 28 casos 9 presentaron metástasis a pulmón; la sintomatología asociada a las metástasis fue: en 2 casos disnea, 1 caso con tos, 1 caso con otros síntomas y 5 casos no reportan síntomas asociados. Todos los pacientes fueron sometidos a resección de metástasis posterior a quimioterapia. La mediana de metástasis resecadas fue de 6 (rango de 1 a 69), con 3 pacientes en los cuales no se encontraba la información en el expediente.

Con respecto a los esquemas de quimioterapia utilizados; en el grupo sin metástasis: 6 pacientes recibieron cisplatino arterial, 3 pacientes recibieron cisplatino, adriamicina, etopósido e ifosfamida y 1 paciente recibió cisplatino, adriamicina, etopósido, ifosfamida y metotrexate. En el grupo con metástasis: 6 pacientes recibieron cisplatino arterial; 3 pacientes recibieron: cisplatino, adriamicina, etopósido e ifosfamida y 3 pacientes recibieron: cisplatino, adriamicina, etopósido, ifosfamida y metotrexate; En el grupo de pacientes sin metástasis 5 pacientes abandonaron tratamiento; 4 fallecieron durante el tratamiento, 3 murieron con actividad tumoral, uno murió por progresión de la enfermedad con metástasis al pulmón y 2 murieron después de lograr vigilancia por recaída a pulmón; al momento 7 pacientes se encontraban vivos sin actividad tumoral de este grupo un paciente tuvo recaída con metástasis única pulmón había recibido cisplatino intraarterial como esquema de inicio y se rescató con etopósido y metotrexate.

Relacionado a los pacientes con metástasis al diagnóstico: 1 paciente se encontraba en tratamiento al momento de la captura de datos, 2 pacientes abandonaron previo al inicio tratamiento. En 6 casos no se logró el control de la enfermedad y fallecieron por progresión, en 4 de estos 6 casos se había logrado el control de la enfermedad inicial, sin embargo hubo recaída a pulmón. La mediana de tiempo de la recaída a la muerte fue de 5 meses con un rango de 1 a 10 meses).

Tabla 1. Características de las muestras patológicas incluidas en el estudio. Se analizaron 32 muestras correspondientes a 28 pacientes.

Muestra	Edad	Género	Sitio primario	Metástasis al diagnóstico		Condición actual
				Si	No	
1	10	M	Húmero proximal	x		Muerto con enfermedad
2	10	F	Fémur distal		x	Abandono con enfermedad
3	13	F	Tibia proximal		x	Vivo sin enfermedad
4	13	F	Tibia proximal	x		Muerto tratamiento
5	11	F	Fémur distal		x	Abandono con enfermedad
6	6	M	Fémur distal		x	Abandono con enfermedad
7	10	M	Peroné		x	Muerto tratamiento
8	15	F	Fémur distal		x	Muerto con enfermedad
9	11	F	Húmero proximal	x		Muerto con enfermedad
10	15	F	Fémur distal		x	Muerto con enfermedad
11	15	F	Fémur distal	x		Muerto con enfermedad
* 12	12	M	<i>Tibia proximal</i>		x	<i>Vivo sin enfermedad</i>
13	9	F	Fémur distal		x	Vivo sin enfermedad
14	14	F	Húmero proximal		x	Abandono con enfermedad
15	14	M	Fémur distal		x	Vivo sin enfermedad
*16	12	F	<i>Tibia proximal</i>	x		<i>Vivo sin enfermedad</i>
*17	11	F	<i>Peroné</i>		x	<i>Vivo sin enfermedad</i>
18	10	F	Metástasis pulmonar		x	Abandono con enfermedad
19	15	M	Peroné	x		Muerto con

						enfermedad
20	13	F	Metástasis pulmonar	x		Muerto con enfermedad
21	10	F	Fémur distal		x	Abandono con enfermedad
22	10	M	Metástasis pulmonar		x	Muerto con enfermedad
23	13	M	Desarticulación fémur distal		x	Abandono con enfermedad
24	15	F	Metástasis pulmonar	x		Muerto con enfermedad
25	15	F	Metástasis pulmonar	x		Muerto con enfermedad
26	13	M	Fémur distal		x	Vivo sin enfermedad
27	13	M	Biopsia diagnóstica		x	Abandono con enfermedad
28	15	F	Fémur distal		x	Vivo sin enfermedad
29	12	F	Fémur distal		x	Muerto con enfermedad
30	15	M	Fémur distal	x		Muerto con enfermedad
31	9	M	Fémur distal		x	Vivo sin enfermedad
32	12	F	Metástasis pulmonar		x	Muerto con enfermedad

* Muestras eliminadas del análisis por mostrar expresión negativa de vimentina.

En la creación del microarreglo se incluyeron 7 muestras de osteosarcoma sin haberse logrado recolectar la información clínica de los mismos (muestras 33 a 39)

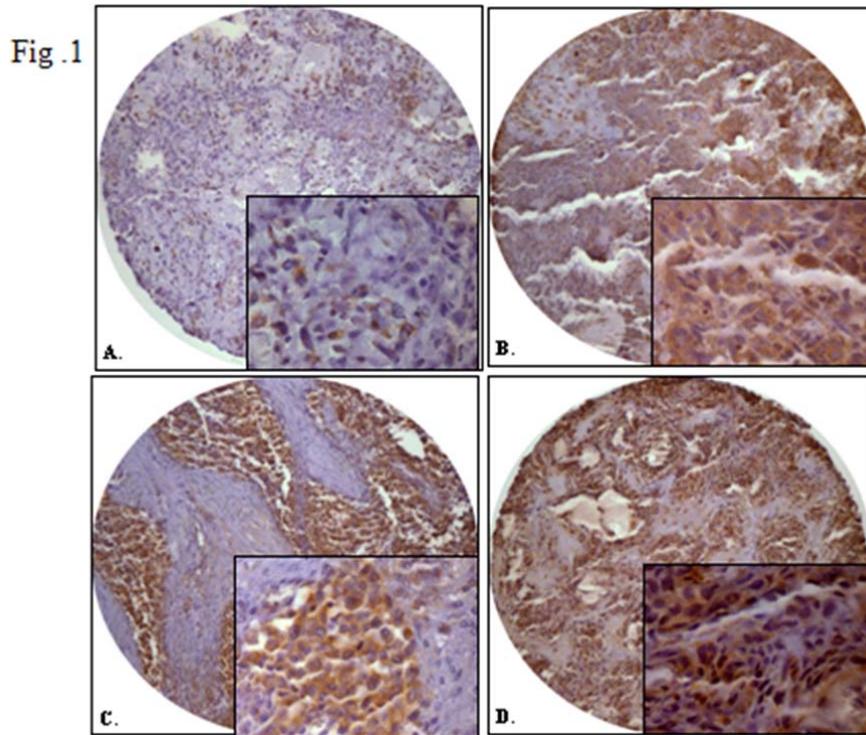
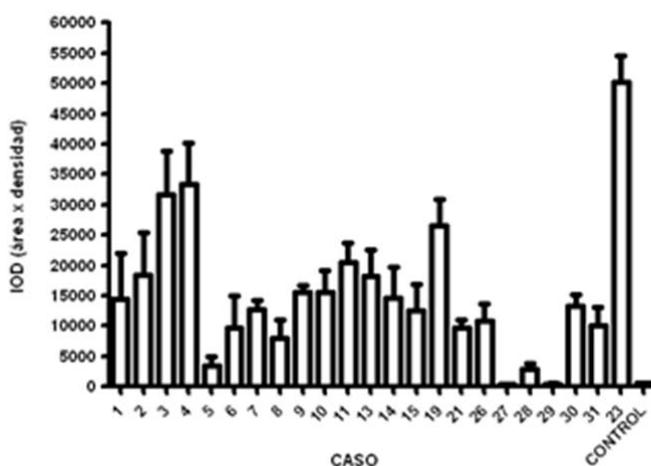


Fig. 1. Expresión de Fas en muestras de pacientes con osteosarcoma. A. Baja expresión de Fas (290.91 IOD) localizada en citoplasma en muestra de biopsia de paciente sin enfermedad metastásica. B. Expresión media (4779.49 IOD) de Fas localizada en citoplasma de biopsia de paciente sin enfermedad metastásica. C. Expresión alta de Fas (29548.17 IOD) localizada en citoplasma de metástasis pulmonar. D. Expresión alta de Fas (39858.18 IOD) en biopsia de paciente con enfermedad metastásica.

Fig. 2 Determinación de Fas en Muestras de Biopsia de Osteosarcoma



La muestra 23 corresponde a una muestra de paciente postquimioterapia.

Fig. 2. Expresión de Fas cuantificada por IOD. Al agruparse todas muestras obtenidas de biopsias del sitio primario tanto al momento del diagnóstico como después de quimioterapia (únicamente muestra 23) se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). A partir prueba Dunn se encuentran diferencias entre:

La muestra 3 (biopsia diagnóstica de paciente sin metástasis, vivo sin actividad) comparada con la muestra 27 (biopsia diagnóstica de paciente sin metástasis, vivo sin actividad), comparada con muestra 29 (biopsia diagnóstica de paciente con metástasis, con recaída a pulmón y sitio primario muerto con enfermedad) y con el control (tejido normal que se sabe expresa constitutivamente Fas).

La muestra 4 (biopsia diagnóstica de paciente sin metástasis muerto durante tratamiento) comparado con muestra 27 (biopsia diagnóstica de paciente sin metástasis, vivo sin actividad), muestra 29 (biopsia diagnóstica de paciente con metástasis, con recaída a pulmón y sitio primario muerto con enfermedad) y con control (tejido normal hepático que se sabe expresa constitutivamente Fas).

La muestra 5 (biopsia diagnóstica sin enfermedad metastásica con abandono) comparada con muestra 23 (desarticulación postquimioterapia de paciente sin metástasis al diagnóstico, vivo sin enfermedad).

La muestra 11 (biopsia diagnóstica de paciente con enfermedad metastásica muerto con enfermedad) comparada con muestra 27 (biopsia de paciente sin metástasis, vivo sin actividad) y muestra 29 (biopsia diagnóstica de paciente con metástasis, con recaída a pulmón y sitio primario muerto con enfermedad).

La muestra 19 (metástasis pulmonar de paciente con metástasis al diagnóstico, muerto con enfermedad) comparada con muestra 27 (biopsia diagnóstica de paciente sin metástasis al diagnóstico, vivo sin enfermedad) y comparada con muestra 29 (biopsia diagnóstica de paciente metastásico al diagnóstico con recaída a sitio primario y pulmón, muerto con enfermedad).

La muestra 23 (desarticulación postquimioterapia de paciente sin metástasis al diagnóstico, vivo sin enfermedad) comparada con muestra 27 (biopsia diagnóstica del mismo paciente), comparada con muestra 28 (biopsia diagnóstica de paciente sin metástasis al momento diagnóstico vivo sin enfermedad), comparada con muestra 29 (biopsia diagnóstica de paciente metastásico al diagnóstico con recaída a sitio primario y pulmón, muerto con enfermedad) y con control (tejido normal hepático que se sabe expresa constitutivamente Fas).

Fig. 3 Determinación de Fas en Muestras de Metástasis de Osteosarcoma

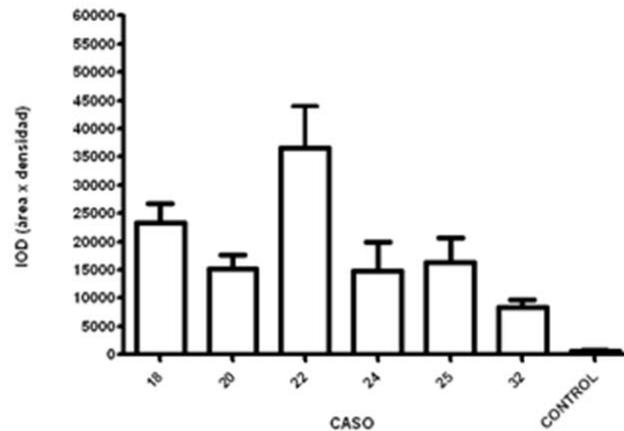


Fig. 3. Expresión de Fas cuantificada por IOD. Al agrupar todas las muestras que provienen de metástasis pulmonares en la comparación se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). A partir prueba Dunn se encuentran diferencias entre:

La muestra 18 (metástasis pulmonar de paciente con recaída a pulmón muerto con enfermedad) comparada con el control (tejido normal hepático que se sabe expresa constitutivamente Fas).

La muestra 22 (metástasis pulmonar de paciente con metástasis al diagnóstico, vigilancia y posterior recaída a primario y pulmón; actualmente muerto con actividad) comparado con el control (tejido normal hepático que se sabe expresa constitutivamente Fas).

Fig. 4 Determinación de Fas en Muestras de Biopsia y Metástasis de Osteosarcoma sin información de paciente

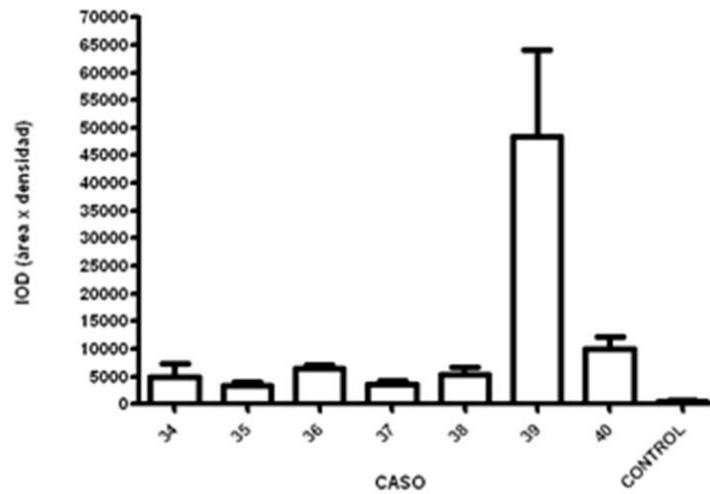


Fig. 4. Expresión de Fas cuantificada por IOD. Al agrupar todas las muestras obtenidas de biopsia diagnósticas y metástasis pulmonares sin información clínica se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). A partir prueba Dunn se encuentran diferencias entre:
La muestras 36, 39 y 40 comparadas con el control.

Fig.5 Determinación de Fas en Muestras de Biopsia y Metástasis de Osteosarcoma provenientes del mismo paciente

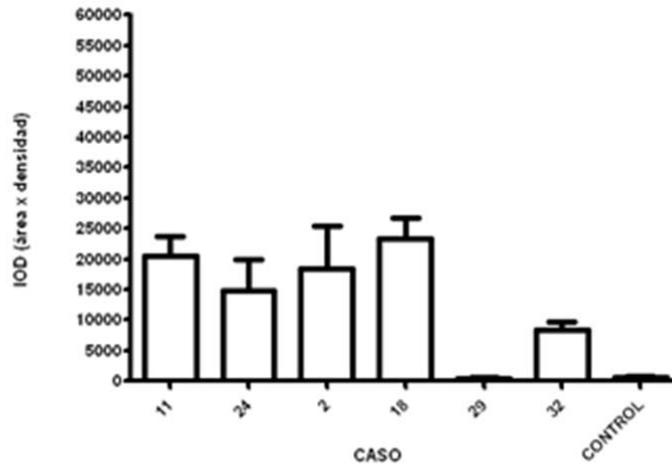


Fig. 5. Expresión de Fas cuantificada por IOD. Al agrupar las muestras obtenidas de biopsia diagnósticas y metástasis pulmonares obtenidas del mismo paciente se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). A partir prueba Dunn se encuentran diferencias entre:

La muestra 29 (biopsia diagnóstica) y muestra 32 (metástasis) correspondiente a paciente con enfermedad metastásica al diagnóstico y posterior recaída a sitio primario y pulmón, muerto con enfermedad.

Fig. 6

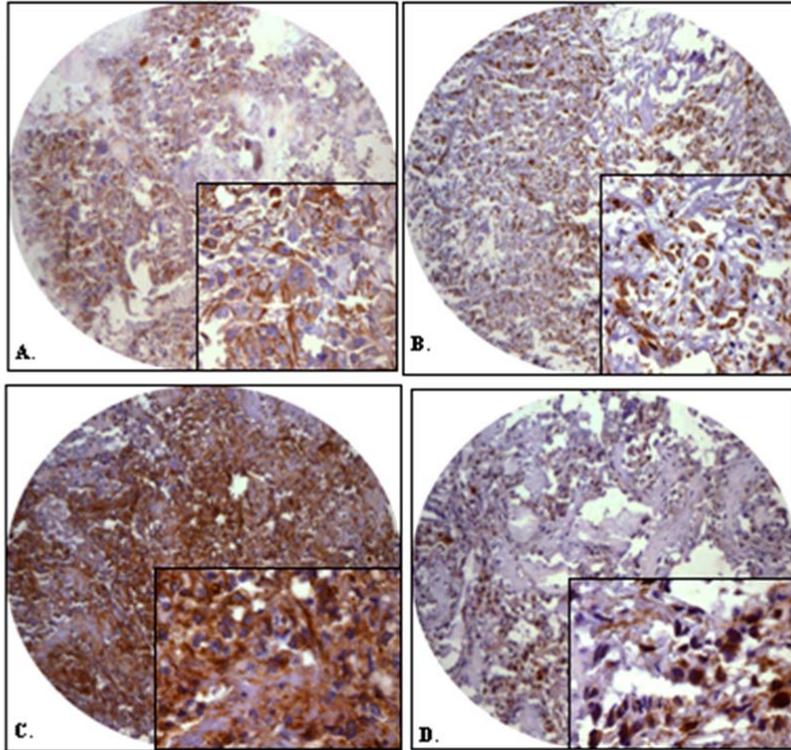
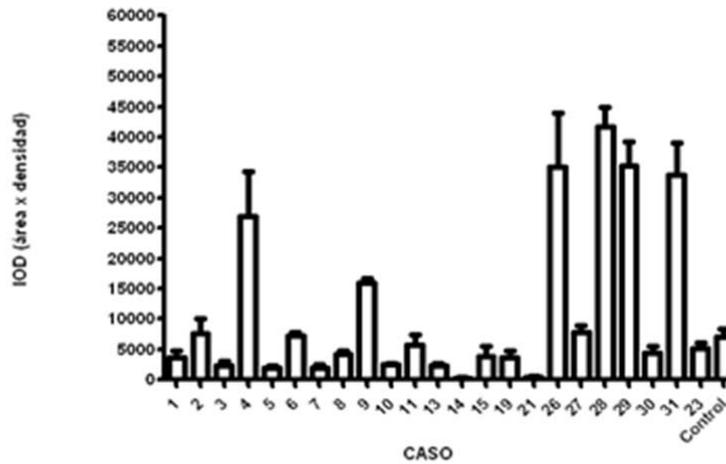


Fig. 6. Expresión de YY1 en muestras de osteosarcoma. A. Baja expresión de YY1 (1363 IOD) localizada en citoplasma en muestra de biopsia de paciente masculino sin enfermedad metastásica. B. Expresión media de YY1 (7994.7 IOD) localizada en citoplasma de biopsia diagnóstica paciente masculino sin enfermedad metastásica. C. Expresión alta de YY1 (33764.1 IOD) localizada en citoplasma de metástasis pulmonar de osteosarcoma. D. Expresión nuclear de YY1 (1455.53 IOD) en desarticulación de paciente con enfermedad metastásico sin tratamiento de quimioterapia previo.

Fig. 7 Determinación de YY1 en Muestras de Biopsia de Osteosarcoma



La muestra 23 corresponde a una muestra de paciente postquimioterapia.

Fig. 7. Expresión de YY1 cuantificada por IOD. Al agruparse todas muestras obtenidas de biopsias del sitio primario tanto al momento del diagnóstico como después de quimioterapia (únicamente muestra 23) se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). A partir prueba Dunn se encuentran diferencias entre:

La muestra 4 (biopsia diagnóstica de paciente sin metástasis muerto durante tratamiento) comparado con la muestra 14 (biopsia diagnóstica de paciente sin enfermedad metastásica) y con la muestra 21 (biopsia diagnóstica de paciente con enfermedad metastásica en tratamiento al momento captura de datos).

La muestra 5 (biopsia diagnóstica de paciente sin enfermedad metastásica con abandono de tratamiento) comparado con la muestra 28 (paciente sin enfermedad metastásica vivo al momento) y con la muestra 31 (paciente sin enfermedad metastásica vivo sin enfermedad).

La muestra 7 (biopsia diagnóstica sin enfermedad metastásica muerto sin enfermedad) comparada con muestra 28 (biopsia diagnóstica de paciente sin metástasis al momento diagnóstico vivo sin enfermedad).

La muestra 14 (biopsia diagnóstica de paciente sin enfermedad metastásica) comparado con muestra 26 (biopsia paciente con enfermedad metastásica), muestra 28 (biopsia diagnóstica paciente sin enfermedad metastásica) y muestra 31 (biopsia diagnóstica paciente sin enfermedad metastásica).

La muestra 21 (biopsia diagnóstica de paciente con enfermedad metastásica en tratamiento al momento captura de datos) comparada con muestra 26 (biopsia diagnóstica de paciente con metástasis al momento diagnóstico vivo sin enfermedad al momento), comparada con muestra 28 (biopsia diagnóstica de paciente sin metástasis al momento diagnóstico vivo sin enfermedad) y muestra 31 (biopsia diagnóstica de paciente sin metástasis, vivo sin enfermedad)

Fig. 8 Determinación de YY1 en Muestras de Metástasis de Osteosarcoma

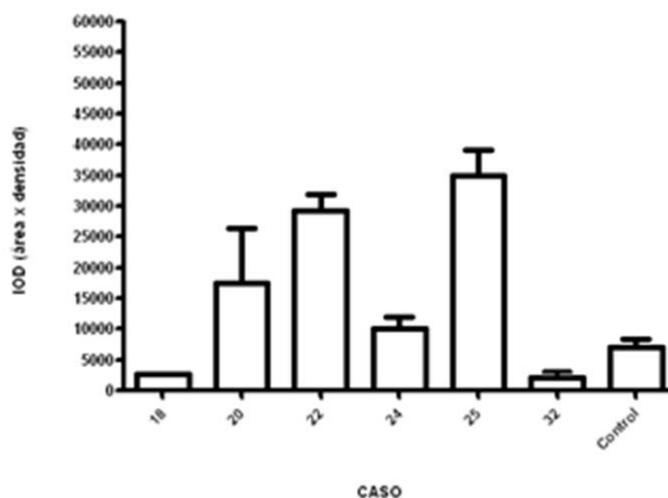


Fig. 8. Expresión de YY1 cuantificada por IOD. Al agrupar todas las muestras que provienen de metástasis pulmonares en la comparación se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). A partir prueba Dunn se encuentran diferencias entre:

La muestra 22 (metástasis pulmonar de paciente con metástasis al diagnóstico, vigilancia y posterior recaída a primario y pulmón; actualmente muerto con actividad) comparado muestra 32 (metástasis pulmonar de paciente con recaída a pulmón y sitio primario, muerto con enfermedad).

La muestra 25 (metástasis pulmonar de paciente con metástasis al diagnóstico con abandono con enfermedad) comparado con la muestra 32 (metástasis pulmonar de paciente con recaída a pulmón y sitio primario, muerto con enfermedad).

Fig. 9 Determinación de YY1 en Muestras de Biopsia y Metástasis de Osteosarcoma sin información de paciente

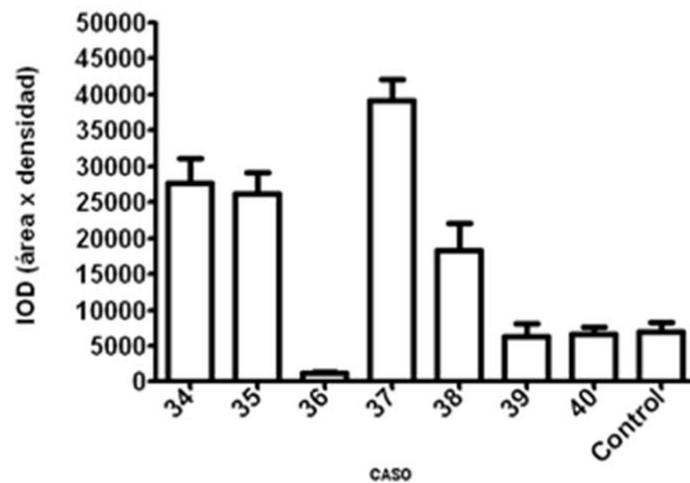


Fig. 9. Expresión de YY1 cuantificada por IOD. Al agrupar todas las muestras obtenidas de biopsia diagnósticas y metástasis pulmonares sin información clínica se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). A partir prueba Dunn se encuentran diferencias entre:

La muestras 34 y 35 comparadas con muestra 36.

La muestra 36 comparada con muestra 37.

La muestra 37 comparada con muestra 39, 40 y control.

Fig. 10 Determinación de YY1 en Muestras de Biopsia y Metástasis de Osteosarcoma provenientes del mismo paciente

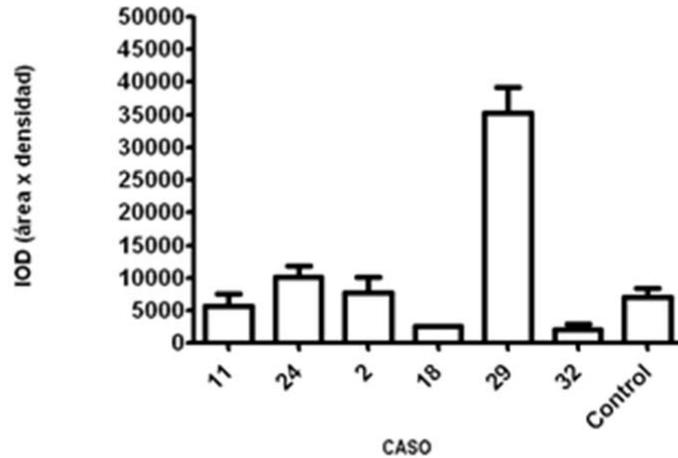


Fig. 10. Expresión de Fas cuantificada por IOD. Al agrupar las muestras obtenidas de biopsia diagnósticas y metástasis pulmonares obtenidas del mismo paciente se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). A partir prueba Dunn se encuentran diferencias entre:

La muestra 29 (biopsia diagnóstica) y muestra 32 (metástasis) correspondiente a paciente con enfermedad metastásica al diagnóstico y posterior recaída a sitio primario y pulmón, muerto con enfermedad.

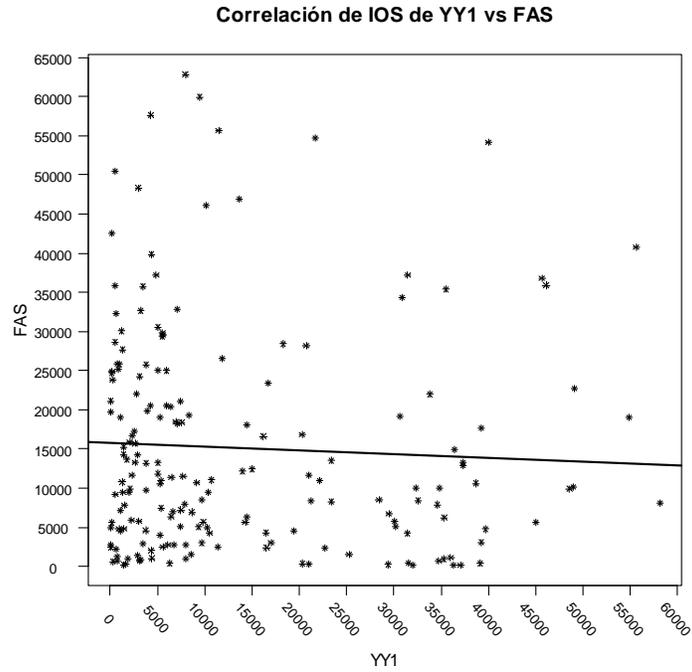


Fig. 11. Se observa una tendencia a una relación lineal inversamente proporcional entre los valores obtenidos de IOS de YY1 comparados con Fas de acuerdo a prueba de Spearman sin tener una p estadísticamente significativa.

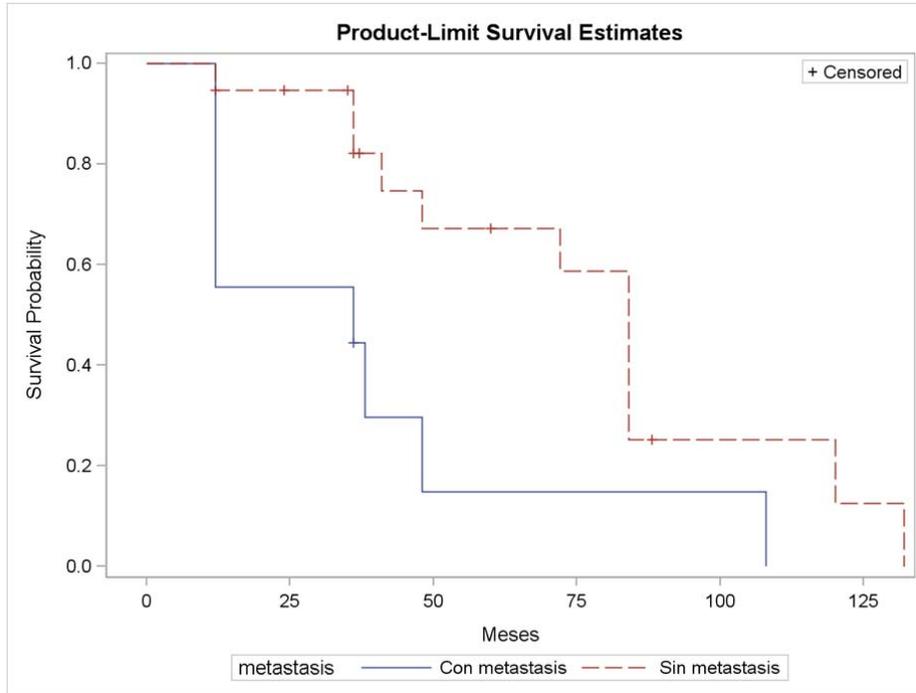


Fig. 12. Función de supervivencia mediante Kaplan-Meier del tiempo del diagnóstico a la captura de datos. Los pacientes sin metástasis (línea punteada) tuvieron una mediana de supervivencia de 84 meses (rango de 41 a 120) comparado con los que presentaron metástasis (línea continua) con una mediana de 36 meses (rango de 12 a 48) con una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.0028$). Se observó que un paciente con metástasis presenta 3 veces más riesgo de muerte que un niño sin metástasis. El resto de las variables en un análisis multivariado no demostraron una relación con la supervivencia de los pacientes.

IX. DISCUSIÓN

Referente a las diferencias observadas en la epidemiología de los pacientes comparativamente con la literatura como la mayor incidencia en hombres comparados con las mujeres (relación hombre: mujer 1.3:1) esta no se corrobora en nuestra series con una relación hombre: mujer de 1:1.8; sin embargo esto se puede explicar debido al proceso de selección basado en la presencia de suficiente tejido viable en las muestras de patología por lo cual un segmento de la población puede estar subrepresentado.

En cuanto al sitio de ubicación se observa una coincidencia al presentar al fémur como el sitio más frecuente (16/28).

En cuanto al porcentaje de metástasis fue de 30% lo cual es mayor a lo reportado en otras series de Europa y EUA (28%); sin embargo acorde con lo publicado por el INP (30%).

Al momento de la captura de datos, 36% de los pacientes sin metástasis (7/19) se encontraban vivos sin enfermedad lo cual es menor a lo reportado en series de EUA y Europa (75%) ; aunque similar a lo publicado por un grupo brasileño (45.5%) . Entre los factores que podrían explicar este resultado es el alto porcentaje de abandono reportado (26%) y la heterogeneidad en los esquemas de quimioterapia; ambos relacionados con el período en el que se capturaron los datos y ya controlados por el servicio de Oncología Pediátrica. (Tabla 1)

Asimismo observamos que la supervivencia de los pacientes con metástasis fue de 11% (1/9) que es menor a lo reportado en las series (28 a 40%); esta disminución podría estar explicada por un mayor número de metástasis al momento de diagnóstico y al alto porcentaje de complicaciones durante el tratamiento que impiden la administración de dosis terapéuticas con la consecuente disminución en el porcentaje de necrosis (promedio 62.8%); sin embargo llama la atención el hecho de que en este grupo hay un buen control inicial de la enfermedad en 4 casos con posterior recaída a pulmón y muerte por progresión de la enfermedad.

Una alteración en el proceso de apoptosis es un factor ya conocido en la carcinogénesis. Una de los mecanismos más estudiados es la relación Fas/Fas L. Recientemente la muerte celular mediada por Fas ha sido implicada como regulador del desarrollo y progresión tumoral. Estudios han demostrado que cuando Fas está inhibido o bien hay una alteración en su señalización la muerte celular mediada por este mecanismo puede perderse. En el caso del tejido pulmonar, el cual expresa constitutivamente FasL, se considera que las células neoplásicas que presentan una menor expresión serían capaces de evadir dicho mecanismo llevando a la implantación de metástasis. El hallazgo de la presencia de Fas en las muestras de osteosarcoma en biopsias diagnósticas, en muestras de desarticulación y en metástasis pulmonares coincide con lo previamente reportado por el grupo de Kleinerman (Fig.1).

Este grupo a partir de modelos animales demostraron que las células de osteosarcoma evaden los mecanismos de apoptosis a nivel pulmonar con el consiguiente desarrollo de metástasis pulmonares; en nuestro caso no siempre se lograron detectar diferencias entre metástasis y biopsias (Figs. 2,3,4); sin embargo en el caso de las muestras 11 y 24 que corresponden respectivamente a biopsia diagnóstica y metástasis de un paciente se observa una mayor expresión de Fas en la biopsia comparativamente con la metástasis, en este caso el paciente se presentó con metástasis al momento del diagnóstico lo cual coincide con lo reportado por dicho grupo cuyos resultados muestran que las biopsias diagnósticas presenta mayor presencia de Fas en relación con las metástasis pulmonares. En otro caso de las muestras 2 y 18 se observa una presencia similar entre la expresión de Fas entre la biopsia diagnóstica y la metástasis sin embargo esta metástasis se presentó por una recaída que podría explicarse por una supervivencia de las células neoplásicas dotadas con mecanismos de evasión de Fas. El último caso correspondiente a las muestras 29 y 32 se observa una menor expresión en la biopsia diagnóstica comparada con la metástasis, este paciente se presentó con metástasis al momento diagnóstico y presentó progresión de la enfermedad tanto en el sitio primario como en pulmones; probablemente a pesar de presentar una mayor expresión de Fas en metástasis podría haber presentado una alteración en su señalización lo cual conllevó a una evasión de la muerte celular (Fig. 5). A partir de esta información se corrobora que la relación Fas/Fas L juega un papel muy importante en el proceso de metástasis de osteosarcoma.

La detección de YY1 (Fig. 6) en muestras de osteosarcoma obtenidas tanto en biopsias diagnósticas, desarticulación postquimioterapia y en metástasis pulmonares confirma los resultados ya publicados por el grupo de Nigris (referencia) los cuales encontraron tanto por inmunohistoquímica como por RT-PCR una mayor expresión de este factor de transcripción en el tejido neoplásico comparado con tejido óseo sano. Asimismo se detectó su presencia tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear.

En cuanto a la intensidad de la expresión de YY1 cuantificada por IOD (Figs. 7,8 9 y 10) se observó una gran heterogeneidad en los niveles con valores que demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes pacientes (incluso pacientes con el mismo espectro clínico, por lo tanto estas diferencias deben tomarse con reserva); probablemente explicado por el hecho de que el proceso de implantación metastásica intervienen un gran número de procesos tales como alteración en el ciclo celular y angiogénesis.

El proceso de carcinogénesis y metástasis es muy complejo con múltiples moléculas interactuando; entre las relaciones ya mencionadas se encuentra la interacción entre Fas y YY1; nuestros resultados corroboran lo ya reportado por el grupo de Huerta quienes demostraron una represión por parte de YY1 en la transcripción de Fas; sin embargo este es el primer reporte que demuestra esta tendencia a una relación inversa en muestras de osteosarcoma (Fig 11).

Hasta el momento uno de los factores más relacionados con la supervivencia de los pacientes con osteosarcoma ha sido la presencia de enfermedad metastásica. Los resultados obtenidos en este estudio corroboran dicho hallazgo confiriéndole

un riesgo tres veces mayor de muerte la presencia de metástasis (Fig. 13). El resto de las variables estudiadas no demostraron una significancia estadística probablemente relacionado con lo pequeño de la muestra.

Ambas moléculas estudiadas se encontraron presentes en las muestras y se han relacionado con el proceso de metástasis por lo cual encontrar mecanismos para intervenir en sus funciones podría implicar una mejoría en la respuesta a la quimioterapia. Hasta el momento se han descrito diversos fármacos y moléculas capaces de sensibilizar a las células neoplásicas a la apoptosis; entre los cuales se encuentran la endostatina, un inhibidor de la angiogénesis, el muramilo fosfatidiletanolamina tripéptido liposomal un activador de los monocitos y macrófagos, IL-12, entre otros, la mayoría de los cuales se encuentran en etapa de investigación en modelos animales.

Otra potencial vía de interacción relacionada con metástasis y angiogénesis es la descrita por el grupo de Nigris quienes documentaron una relación entre YY1 y el receptor de citocinas CXCR4; reportando una regulación positiva de YY1 sobre la transcripción de CXCR4 siendo, por consiguiente, un regulador positivo de la angiogénesis y migración de las células de osteosarcoma³⁸. Confirmando estos estudios el grupo de Laverdiere a partir de la cuantificación de niveles de expresión de RNAm de CXCR4 demostró que éstos se relacionan con la supervivencia en un grupo de 26 pacientes⁴². Sin duda la identificación de genes y vías de señalización responsables del desarrollo y malignización del osteosarcoma llevarán al descubrimiento de nuevos fármacos y terapias tan necesarios para mejorar la supervivencia en los pacientes con osteosarcoma.

X. CONCLUSIONES.

A pesar del proceso de descalcificación al cual son sometidas las muestras de osteosarcoma fue posible determinar la presencia de Fas y YY1 en muestras de osteosarcoma de pacientes pediátricos obtenidas tanto en biopsias diagnósticas, en desarticulación postquimioterapia y en metástasis pulmonares.

Se observó la presencia de YY1 y Fas tanto en el núcleo como en el citoplasma en tejido de osteosarcoma de pacientes pediátricos.

Hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de YY1 entre las muestras provenientes de diferentes sitios.

Hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Fas entre las muestras provenientes de diferentes sitios.

Al realizar un análisis de correlación se observa una tendencia a una relación lineal inversamente proporcional.

En el análisis multivariado la única variable que demostró afectar la supervivencia de los pacientes fue la presencia de metástasis; la cual confiere un riesgo 3 veces mayor de muerte ($p= 0.0028$).

La detección de Fas y YY1 en las muestras de osteosarcoma brinda información sobre las bases moleculares de las células tumorales probablemente relacionadas con el proceso de carcinogénesis.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Pizzo P, ed. Principles and practice of pediatric oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006.
2. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol* 2002; 20:776-90.
3. Fajardo-Gutierrez A. Incidencia general y específica de cáncer en niños derechohabientes del IMSS. *Rev Med IMSS* 2007; 45:579-92.
4. Klein MJ. Osteosarcoma. Anatomic and Histologic Variants. *Am J Clin Pathol* 2006; 125:555-81.
5. Tsuchiya H, Kanazawa Y, Abdel-Wanis ME, et al. Effect of timing of pulmonary metastases identification on prognosis of patients with osteosarcoma: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2002;20:3470-7.
6. Hudson M, Jaffe MR, Jaffe N, et al. Pediatric osteosarcoma: therapeutic strategies, results, and prognostic factors derived from a 10-year experience. *J Clin Oncol* 1990; 8:1988-97.
7. Rech A. Clinical features in Osteosarcoma and Prognostic Implications. *Jornal de Pediatria* 2003; 80:65-70.
8. Clark Jonathan DrC. A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:281-97.
9. Kempf-Bielack B, Bielack SS, Jurgens H, et al. Osteosarcoma relapse after combined modality therapy: an analysis of unselected patients in the Cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS). *J Clin Oncol* 2005;23:559-68.
10. Link M. Chemotherapy for non-metastatic osteogenic sarcoma: The Memorial Sloan Kettering Experience. *J Clin Oncol* 1992;10:5-15.
11. Myoui A. Neoadjuvant chemotherapy with intraarterial doxorubicin and other systemic agents in the treatment of stage II osteosarcoma of the extremities. *Ann Cancer Res Ther* 1995:43-7.
12. Souhami R. Randomised trial of two regimens of chemotherapy in operable osteosarcoma: a study of the European Osteosarcoma Intergroup. *Lancet* 1997;350:911-7.
13. Uchida A. Neoadjuvant chemotherapy for pediatric osteosarcoma patients. *Cancer* 1997;79:411-5.
14. Mintz MB, Sowers R, Brown KM, et al. An expression signature classifies chemotherapy-resistant pediatric osteosarcoma. *Cancer research* 2005;65:1748-54.
15. 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;106:1154-61.
16. Davis AM, Bell RS, Goodwin PJ. Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review. *J Clin Oncol* 1994;12:423-31.

17. Kager L, Zoubek A, Potechger U, et al. Primary metastatic osteosarcoma: presentation and outcome of patients treated on neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group protocols. *J Clin Oncol* 2003;21:2011-8.
18. Marina N. Biology and Therapeutic Advances for Pediatric Osteosarcoma. *The Oncologist* 2004;9:422-41
19. Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, 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;12:1145-50.
20. Serra M, Scotlandi K, Reverter-Branchat G, et al. Value of P-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities. *J Clin Oncol* 2003;21:536-42.
21. Gallegos-Castorena S. Neoadjuvant Chemotherapy in Osteosarcoma: the Experience at the Hospital Infantil de Mexico from August 1996 to August 1999. *Medical and Pediatric Oncology* 2001;36:407.
22. Gorlick R. Biology of Childhood Osteogenic Sarcoma and Potential Targets for Therapeutic Development: Meeting Summary. *Clinical Can Res* 2003;9:5442-53.
23. Petrilli A. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV. Prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol* 2006;24:1161-8.
24. Niembro AM. Resultados de ocho años en el tratamiento de osteosarcoma. Experiencia en el Instituto Nacional de Pediatría. *Gamo* 2005;4:70-5.
25. Ragland D B, Bell Walter C. Cytogenetics and Molecular Biology of Osteosarcoma. *Lab Invest* 2002;82:365-73.
26. Ryungsa K. The Role of Fas ligand and transforming Growth Factor Beta in Tumor Progression. *Cancer* 2004;100:2281-91
27. Moller P. Expression of APO-1(CD95) a member of the TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 1994;57:371-7.
28. Schaub O. Fas and Fas ligand interactions suppress melanoma lung metastasis. *J Exp Med* 1998;188:1717-23.
29. Lafleur E. Increased Fas Expression Reduces the Metastatic Potential of Human Osteosarcoma Cell. *Clinical Can Res* 2004;10:8114-9.
30. Kleinerman ES. Fas-Negative Osteosarcoma Tumor Cells Are Selected during Metastasis to the Lungs: The Role of the Fas Pathway in the Metastatic Process of Osteosarcoma. *Mol Cancer Res* 2007;5:991-9.
31. Gordon S. Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene* 2006;25:1125-42.
32. Hongo F. Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 336:692-701.
33. Shi Y. Everything you have ever wanted to know about Ying Yang 1. *Biochim Biophys Acta* 1997;1332:F49-66.
34. Hakem R. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 1998;94:339-52.
35. Hockenbery D. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:6961-5.
36. Selligson D HS. Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer. *Int J Oncol* 2005;27:131-41.
37. Nigris Fd. Expression of transcription factor Ying Yang 1 in human osteosarcomas. *Eur J Cancer* 2006;42:2420-4.

38. Nigris Fd. Deletion of Yin Yang 1 Protein in Osteosarcoma Cells on Cell Invasion and CXCR4/Angiogenesis and Metastasis. *Cancer research* 2008;68:1797-808.
39. Vincek V. A tissue fixative that protects macromolecules (DNA, RNA and protein) and histomorphology in clinical samples. *Lab Invest* 2003;83:1427-35.
40. Nadji. M. Immunochemistry of tissue prepared by a molecular-friendly fixation and processing system. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005;13:277-82.
41. Cote R, ed. *Modern Surgical Pathology*; 2003.
42. Laverdiere C, Hoang BH, Yang R, et al. Messenger RNA expression levels of CXCR4 correlate with metastatic behavior and outcome in patients with osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:2561-7.