

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA



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

**TESIS DE POSTGRADO PARA OBTENER EL GRADO DE
SUBESPECIALIDAD EN CIRUGIA ONCOLOGICA**

**DETERMINACIÓN DE LA PROTEINA HER-2 EN MUESTRAS DE
PACIENTES CON OSTEOSARCOMAS**

PRESENTA:

DR. ZAKI ANTONIO TAISSOUN ASLAN

ASESOR DE TESIS:

DR. LUIS A. HERRERA MONTALVO

MÉXICO, D.F., MARZO 2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

AUTORIZACIONES

DR. ZAKI ANTONIO TAISSOUN ASLAN
RESIDENTE DE TERCER AÑO DE CIRUGIA ONCOLÓGICA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
AUTOR

DR. LUIS A .HERRERA MONTALVO
DIRECTOR DE INVESTIGACION
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA
ASESOR

DRA. SILVIA VERÓNICA VILLAVICENCIO VALENCIA
SUBDIRECTORA DE EDUCACIÓN MÉDICA
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

AUTORES

TESISTA:

Dr. Zaki Antonio Taissoun Aslan
Médico Residente de Tercer Año
Subespecialidad en Cirugía Oncológica
Instituto Nacional de Cancerología

ASESOR DE TESIS:

Dr. Luis A. Herrera Montalvo
Director de Investigación
Instituto Nacional de Cancerología

COLABORADORES:

Dr. Mario Cuellar Hubbe
Jefe del Departamento de Piel y partes blandas
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Alejandro Padilla Rosciano
Médico Adscrito del Departamento de Piel y Partes Blandas
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. David Cantú León

Subdirector del Departamento de Investigación Clínica

Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Silvia Verónica Villavicencio

Subdirectora de Educación Médica

Instituto Nacional de Cancerología

Dr. José de la Luz Díaz Chávez

Investigador en Ciencias Médicas "C"

Subdirección de Investigación Básica

Instituto Nacional de Cancerología

ÍNDICE

	Página
1. TÍTULO.....	07
2. MARCO TEÓRICO.....	08
2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	08
2.2 JUSTIFICACIÓN.....	10
2.3 HIPÓTESIS.....	11
2.4 OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1 TIPO DE ESTUDIO	11
3.2 DISEÑO.....	11
3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	11
3.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	12
3.5 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO.....	12
4. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
4.2. DEFINICION DE VARIABLES.....	13
5. CONSIDERACIONES ETICAS.....	18
6. RESULTADOS	18
7. DISCUSIÓN.....	22
8. CONCLUSIONES.....	24
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

1. TÍTULO

**DETERMINACIÓN DE LA PROTEINA HER-2 EN MUESTRAS DE PACIENTES
CON OSTEOSARCOMAS.**

2. MARCO TEÓRICO

2.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

Los osteosarcomas son tumores óseos con baja incidencia, derivados del tejido primitivo mesénquimal caracterizados por la producción de osteoide y células óseas inmaduras.^{1, 2, 3,4}. Aproximadamente se presentan con incidencia mundial en general de 3.3 millones de casos por año. En EUA se diagnostican entre 750 y 900 mil casos nuevos cada año, y aproximadamente 400 mil de estos casos se presentan en niños y adolescentes a los 20 años de edad^{5,6}. Este tipo de tumores es raro, sin embargo, es el tumor primario del hueso más frecuente entre niños y adolescentes, siendo la quinta causa de enfermedad en estas edades, aunque se ha descrito que este tipo de tumores puede presentar una aparición bimodal al aparecer también en adultos mayores de 65 años^{7,8,9}. En México, se han descrito 189 casos de osteosarcoma entre los años 2005-2010 en pacientes menores de 20 años, con una tasa de mortalidad de 0.37 por cada cien mil habitantes¹⁰. El Instituto Nacional de Cancerología de México reporta un total de 304 casos entre los 19-29 años en el periodo 2000-2004¹¹.

El osteosarcoma representa el 56% de los tumores óseos y el 15 % de todos los tumores sólidos extracraneales, y el 1% de todos los tumores diagnosticados en general. El sexo masculino es el más afectado con una incidencia 1.4 mayor que el sexo femenino, siendo predominantemente en caucásicos¹². El sitio de aparición más común del osteosarcoma en niños es la metáfisis de los huesos largos, especialmente del fémur distal (75 por ciento de los casos)⁹. Aunque también se describen con frecuencia en la tibia proximal y el húmero proximal^{4,13}. Se han descrito varios factores de riesgo para la aparición de osteosarcomas, como en los pacientes que recibieron tratamientos como radioterapia por otros tumores sólidos reportando 3% atribuidos a este efecto¹⁴, la exposición previa a quimioterapia, en especial a los agentes alquilantes, se asocia también con osteosarcomas secundarios y puede potenciar el efecto de la radiación anterior¹⁴, lesiones benignas como en la enfermedad de Paget común en pacientes mayores de 40 años donde se produce un recambio óseo acelerado se ha reportado en 0.7% de todos los casos de osteosarcomas¹⁵, otras lesiones benignas son asociadas a transformación maligna como la osteomielitis crónica, exostosis múltiple hereditaria, displasia fibrosa, sitios de implantes óseos, infartos óseos^{16,17}. Existen enfermedades hereditarias que se relacionan con osteosarcoma como el retinoblastoma hereditario, el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Rothmund-Thompson, los síndromes de Werner¹⁸. En series de 235 pacientes McIntyre y cols. demostraron que solo el 3% de los casos presentaban mutaciones de líneas germinales de p53¹⁹. Aunque la etiología del osteosarcoma no es clara, se sugiere una relación entre el crecimiento rápido del hueso y el desarrollo de osteosarcoma, debido a que: 1) el pico de incidencia del osteosarcoma se produce durante el crecimiento de la adolescencia; 2) el tumor aparece con mayor frecuencia en los sitios donde existe un mayor incremento en longitud y tamaño del hueso; 3) los osteosarcomas ocurren a una edad más temprana en las niñas,

que corresponde a su edad ósea más avanzada y aceleración del crecimiento en adolescentes con regeneración y producción de células óseas.

Estos datos han llevado a especular que los tumores óseos se derivan de una aberración del proceso normal de crecimiento y remodelación ósea en un momento en que las células que proliferan más rápidamente son particularmente susceptibles a los agentes oncogénicos, los errores mitóticos u otros eventos que conducen al desarrollo de una neoplasia^{20,21,22}.

La mayoría de los osteosarcomas tienen un cariotipo no balanceado complejo. Una mayor frecuencia de pérdida de heterocigosidad, lo que implica la pérdida de un gen supresor tumoral, se ha reportado una pérdida de los cromosomas 3q, 13q, donde se ubica el gen RB, 17p, donde se ubica gen p53, y 18q, la región cromosómica que se ha relacionado con los osteosarcomas que surgen en el ajuste de la enfermedad de Paget^{23, 24, 25, 26,27}, así como otros múltiples genes tales como NF1, PI3KCA, MDM2, CDK4, YEATS4, HMGA2 y SAS.

Así mismo, se ha descrito la sobre-expresión de algunos oncogenes en casos de osteosarcoma, como el factor de crecimiento epidérmico (c-erbB-2) conocido como HER2. El receptor HER2 pertenece a la familia de receptores tirosina cinasa (RTKs) cuyo miembro principal es el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR. La proteína HER2 se encuentra sobre-expresada en aproximadamente un 20-30% de tumores mamarios, lo cual se debe principalmente a una amplificación del gen *HER2*, correlacionando este evento con un pronóstico menos favorable de las pacientes. Interesantemente, Hannayong y cols. observaron en pacientes con osteosarcomas que el 57% de los pacientes analizados (21 pacientes) sobre-expresaron HER2 y el 12% presentó una expresión moderada (6 pacientes)^{28,29}.

Onda y cols., analizaron 26 pacientes con osteosarcoma convencional evaluando por diferentes métodos la presencia de HER2 en estos tumores (Western Blot, Southern Blot, hibridización *in situ*), y observaron la sobre-expresión de HER2 en 42% de los pacientes, correlacionado clínicamente con metástasis pulmonar temprana, por lo que se propone como un marcador pronóstico de metástasis³⁰. En otro trabajo, Gorlick y cols. analizaron 53 casos entre 1986 y 1999, demostrando una sobre-expresión de HER2 en el 42.6% de los osteosarcomas, y clínicamente se determinó que tenían peor pronóstico y poca respuesta patológica, los pacientes no metastásicos al momento del diagnóstico presentaron mejor periodo libre de enfermedad 79% versus metastásicos 47% a 5 años ($p < 0.05$)³¹. Por su parte Tomohiro y cols. evaluaron la expresión de HER2 en 81 paciente de los cuales 51 (61%) presentaron altos niveles de expresión del oncogén correlacionado clínicamente con un aumento del periodo libre de recurrencia con 72.2% versus 54% en quienes no expresaron el oncogén, con sobrevida global de 79.7%, demostrando que los pacientes con osteosarcomas que sobre-expresan de HER2, que son tratados con cirugía, quimioterapia, sin enfermedad metastásica, obtienen mayor periodo libre de enfermedad y sobrevida global³². Adicionalmente Klemens y cols. encontraron que la expresión de HER2 en pacientes con osteosarcoma se presenta en

40-45% correlacionada con peor pronóstico y metástasis tempranas pulmonares además de presentar poca respuesta a la quimioterapia preoperatoria³³.

En contraparte Kilpatrick y cols. evaluaron 41 pacientes con osteosarcomas por medio de IHQ, H&E y FISH, sin evidencias de sobre-expresión del oncogén *HER2*, así como ninguna relación con el subtipo histológico, metástasis o sobrevida³⁴. Anninga y cols. tampoco observaron sobre-expresión del oncogén *HER2* por IHQ, PCR y FISH, por lo cual sugieren que *HER2* no juega un papel importante en los osteosarcomas de alto grado, además consideraron que los estudios anteriores al suyo no eran confiables, concluyendo que el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin) contra *HER2* no es una terapia efectiva ante estos tumores óseos³⁵.

La supervivencia de pacientes con sarcomas óseos malignos ha mejorado dramáticamente en los últimos 30 años, en gran parte como resultado de los avances quimioterapéuticos. Antes de la era de la quimioterapia efectiva, del 80 al 90% de los pacientes con osteosarcoma presentaban enfermedad metastásica a pesar de lograr el control local de la cirugía; sin embargo, posteriormente se demostró que la mayoría de estos pacientes tenían enfermedad metastásica subclínica que estaba presente en el momento del diagnóstico, incluso en ausencia de metástasis manifiestas.

Debido a que en la literatura existe controversia en si la sobre-expresión del oncogén *HER2* es un factor pronóstico importante en osteosarcomas, en nuestro trabajo determinamos si los osteosarcomas expresan de manera importante la proteína *HER2* y analizamos si puede ser un marcador pronóstico en los tumores óseos, y evaluamos si son asociados a periodos libres de enfermedad y sobrevida global con respecto al pronóstico del paciente.

2.2 JUSTIFICACIÓN

El osteosarcoma representa el 56% de los tumores óseos y el 15 % de todos los tumores sólidos extracraneales. Aunque se considera una neoplasia rara, su importancia radica en que entre el 40 y 50% de los pacientes son niños y adolescente menores de 20 años. El Instituto Nacional de Cancerología de México reporta un total de 304 casos anuales, con una mayor incidencia entre los 19-29 años en el periodo 2000 al 2004.

La búsqueda de biomarcadores en osteosarcoma ha llevado a estudiar al oncogén *HER2* el cual es conocido como un factor de mal pronóstico en aproximadamente un 20-30% de los tumores mamarios, donde se ha estudiado con mayor profundidad, pero también se considera una factor pronóstico de repuesta a la terapia blanco con un anticuerpo dirigido contra la proteína *HER2*. En osteosarcoma se ha estudiado la expresión de *HER2* para elucidar si pudiera funcionar como un marcador o como terapia blanco como en el caso de cáncer de mama; sin embargo, existe controversia en los estudios que se reportan en la literatura, por lo que nos proponemos resolver la pregunta de si los osteosarcomas sobre-expresan el oncogén *HER2* y analizar si puede ser un biomarcador

pronóstico importante en los tumores óseos, además de determinar si su expresión se asocia a periodos libres de enfermedad y sobrevida global.

2.3 HIPÓTESIS

La proteína HER2 se encontrará sobre-expresada en un grupo de pacientes con osteosarcoma de extremidades y pelvis.

2.4 OBJETIVOS

- **OBJETIVO GENERAL:**
 - Determinar la frecuencia de expresión del HER2.
- **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**
 - Determinar los niveles de proteína de HER2 mediante Inmunohistoquímica.
 - Determinar el valor pronóstico de HER2 como un biomarcador pronóstico de los osteosarcomas de extremidades y pelvis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

- Retrospectivo y descriptivo

3.2 DISEÑO

- **Universo de Estudio:** Pacientes con osteosarcomas de extremidades y pelvis registrados en el Instituto Nacional de Cancerología México desde enero del 2000 a junio 2010.
- **Tamaño de la Muestra:** 48 pacientes presentaron especímenes adecuados para su evaluación patológica, la muestra se procesó por H&E, IHQ, y FISH solo en casos indeterminados por IHQ, registrados en el Instituto Nacional de Cancerología entre enero del 2000 y junio 2010.
- **Grupo de Estudio:** Pacientes con osteosarcomas de extremidades y pelvis en el Instituto Nacional de Cancerología.

3.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes de cualquier sexo.
- Diagnóstico de osteosarcoma y subtipos con diferentes grados de diferenciación.
- Tratados en el Instituto Nacional de Cancerología.

- Seguimiento periódico en el Instituto Nacional de Cancerología.

3.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes menores de 15 años.
- Muestras insuficientes.
- Alto contenido de necrosis en la evaluación histopatológica de las muestras.

3.5 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Se revisaron los expedientes clínicos en el período comprendido entre enero de 2000 a junio de 2010, con un universo de 48 pacientes. Todos los pacientes presentaron diagnóstico de osteosarcoma de extremidades y/o pelvis a quienes se les trató con o sin cirugía conservadora, amputación, quimioterapias neoadyuvantes o adyuvantes, radioterapia en algunos casos.

Se obtuvieron especímenes histopatológicos, evaluándose por H&E e IHQ con anticuerpos anti-HER2 y mediante FISH en casos indeterminados o positivos por IHQ.

Inmunohistoquímica

Las laminillas se desparafinaron durante 30 min a 65°C en un horno, después se hidrataron en xileno 20 minutos por duplicado, y se realizó un tren de hidratación utilizando etanol del 100% al 30% durante 10 min cada uno, finalmente se lavaron con agua destilada. Realizamos recuperación del antígeno colocando las laminillas en un contenedor Coplin de plástico con 25 ml de buffer de TRIS-EDTA pH9 en dilución y se llevó a 92°C 40 min. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, se incubaron las laminillas en PBS 1X por 10 minutos. Para eliminar el fondo inespecífico se incubó el tejido con una solución de BSA al 5% en PBS 1X 1 hora en cámara húmeda, enseguida se lavaron las laminillas 3 minutos con PBS-tritón al 0.1%, y después se incubaron toda la noche en cámara húmeda con el anticuerpo primario anti-HER2 (clona 29D8, Cell Signaling Technology) diluido 1:500 en PBS 1X. Al siguiente día, se hicieron 3 lavados de 3 min con PBS-tritón al 0.1% y se incubaron en PBS 1X 5 min. Para inactivar a la peroxidasa endógena se incubaron las laminillas durante 30 min en una solución con peróxido de hidrógeno al 3% (Sigma-Aldrich, 323381) en una relación 1:10 en metanol absoluto (Sigma-Aldrich, M1775). Se hicieron 3 lavados de 3 min con PBS-tritón al 0.1% y se incubaron en PBS 1X 5 min.

Posteriormente, se incubaron las laminillas con el anticuerpo secundario biotinilado (Dako) 30 min, se hicieron 3 lavados de 3 min con PBS-tritón 0.1%, después se agregó el complejo estreptavidina-HRP (Dako) y se dejó incubar 30 min, se lavó de nuevo 3 veces durante 3 min con PBS-tritón 0.1% y se reveló la reacción con diaminobenzidina (DAB, Dako), se detuvo la reacción con 2 lavados de 3 min con PBS 1X y se contrastaron las laminillas con hematoxilina. Finalmente se montaron las laminillas con cubreobjetos con Entellan (Merk, 107960). En todas las laminillas se incluyeron tejidos control tanto positivos y negativos previamente identificados.

4. ORGANIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis estadístico usando estadística descriptiva, medidas de tendencia central (media y desviación estándar), para variables cuantitativas y cualitativas, respectivamente. Para la comparación entre variables, se usó estadística paramétrica y no paramétrica, posterior a la evaluación en la distribución de cada variable. Se usó χ^2 cuadrada para variables categóricas (con el test exacto de Fisher, cuando no cumplía criterios para uso de χ^2 cuadrada). Todos los análisis fueron realizados usando el paquete estadístico SPSS versión 20 (IBM CORPORATION)

4.2 DEFINICIÓN DE VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

- **EDAD:**
 - Definición operativa
 - Se medirá el número de años cumplidos en el expediente físico y electrónico en el momento del diagnóstico.
 - Tipo de variable
 - Cuantitativa discreta
 - Unidad de medición
 - Años
- **SEXO:**
 - Definición operativa
 - División del género humano (hombre o mujer) (masculino o femenino)
 - Tipo de variable
 - Categórica
 - Categoría de la variable
 - Masculino
 - Femenino
- **LABORATORIOS:**
 - Definición operativa

- Procedimiento medico en que se analiza una muestra de sangre ,orina u otra sustancia del cuerpo para determinar un diagnostico
 - Tipo de variable
 - Cuantitativa continua
 - Categoría de las variables
 - Deshidrogenasa Láctica
 - Fosfatasa Alcalina
 - Unidad de Medición
 - Unidades Internacionales sobre Litro (UI/L)
 - Unidades Internacionales sobre Litro (UI/L)
- HISTOLOGIA :
 - Definición operativa
 - En el reporte histopatologico del expediente físico y electrónico
 - Tipo de variable
 - Cualitativa nominal
 - Categoría de las variables
 - Osteosarcoma Osteoblástico
 - Osteosarcoma fibroblástico
 - Osteosarcoma osteogénico
 - Osteosarcoma convencional
 - Osteosarcoma telangectásico
 - Osteosarcoma condroblástico
 - Osteosarcoma mixto.
- TIPO DE MUESTRA :
 - Definición operativa
 - Procedimiento quirúrgico que se realizó para obtención del espécimen histopatologico
 - Tipo de variable
 - Cualitativa nominal
 - Categoría de las variables
 - Resección quirúrgica
 - Biopsia
- LOCALIZACION DEL TUMOR :
 - Definición operativa
 - Sitio de aparición en el cuerpo humano al momento del diagnostico
 - Tipo de variable
 - Cualitativa nominal
 - Categoría de las variables
 - Fémur
 - Tibia
 - Húmero
 - Antebrazo
 - Pelvis
 - Otros sitios
- ETAPA CLINICA :
 - Definición operativa
 - Cantidad o grado de diseminación del cáncer en el cuerpo humano
 - Tipo de variable
 - Cualitativa ordinal

- Categoría de las variables
 - ECIA
 - ECIB
 - ECIIA
 - ECIIB
 - ECIII
- TRATAMIENTO NEOADYUVANTE :
 - Definición operativa
 - Tratamiento que se administra como primer paso para reducir el tamaño tumoral antes del tratamiento principal o radical.
 - Tipo de variable
 - Categórica dicotómica
 - Categoría de las variables
 - Si
 - No
- RESPUESTA A TERAPIA NEOADYUVANTE :
 - Definición operativa
 - Método estándar que se usa para medir el modo en que un paciente de cáncer responde al tratamiento permite determinar si los tumores reducen, permanecen igual o se agrandan medidos por radiología, exploración física
 - Tipo de variable
 - Cuantitativa nominal
 - Categoría de las variables
 - Respuesta completa
 - Respuesta parcial
 - Enfermedad estable
 - Progresión de la enfermedad
- DROGA:
 - Definición operativa
 - Agente de quimioterapia natural o sintético que produce un efecto sobre el tumor o neoplasia
 - Tipo de variable
 - Categórica dicotómica
 - Categoría de las variables
 - Ninguna
 - Mixta
- TOXICIDAD :
 - Definición operativa
 - Grado de efectividad que posee la sustancia que por su composición puede producir daño tisular
 - Tipo de variable
 - Cualitativa nominal
 - Categoría de las variables
 - Hematológica
 - Gastrointestinal
 - Infecciosa
 - Mixta
 - Ninguna

- Unidad de medición
 - Síntomas
 - Signos
 - laboratorios
- PROCEDIMIENTO QUIRURGICO :
 - Definición operativa
 - Operaciones coordinadas que se ejecutan abiertas o cerradas para corregir defectos, deformidades o extirpación de tumores.
 - Tipo de variable
 - Cualitativa nominal
 - Categoría de las variables
 - Amputación
 - Cirugía conservadora
- SANGRADO QUIRURGICO:
 - Definición operativa
 - Cantidad de sangre perdida durante el procedimiento quirúrgico
 - Tipo de variable
 - Cuantitativa continua
 - Unidad de medición
 - Mililitros
- COMPLICACIONES QUIRÚRGICAS :
 - Definición operativa
 - Son aquellas que suceden posterior a un procedimiento quirúrgico de cualquier índole
 - Tipo de variable
 - Cuantitativa dicotómica
 - Categoría de las variables
 - Si
 - No
- TIPOS DE COMPLICACIONES QUIRÚRGICAS :
 - Definición operativa
 - Son aquellas específicas que suceden posterior a un procedimiento quirúrgico de cualquier índole
 - Tipo de variable
 - Cualitativa nominal
 - Categoría de las variables
 - Hemorrágicas
 - Infecciosas
 - Dolor
 - Síndrome de miembro fantasma
 - Luxaciones de prótesis
 - Taponamiento cardiaco
- TRATAMIENTO ADYUVANTE :
 - Definición operativa
 - Tratamiento adicional que se administra después del tratamiento primario para disminuir el riesgo de recurrencias
 - Tipo de variable
 - Categórica dicotómica
 - Categoría de las variables
 - Si

- No
- METASTASIS :
 - Definición operativa
 - Diseminación del cáncer de una parte a otra del cuerpo humano regional o a distancia
 - Tipo de variable
 - Cualitativa nominal
 - Categoría de las variables
 - Si
 - No
 - Al diagnóstico
 - Durante el tratamiento
 - Post-tratamiento
- SITIO DE METASTASIS :
 - Definición operativa
 - Lugar específico de diseminación del cáncer de una parte a otra del cuerpo humano
 - Tipo de variable
 - Cualitativa nominal
 - Categoría de las variables
 - Pulmón
 - Oseas
 - Visceral
 - Ninguna

VARIABLES DEPENDIENTES

- EXPRESION DEL HER2 :
 - Definición operativa
 - Presencia e intensidad de tinción o coloración pardo dorada en la membrana citoplasmática de la célula
 - Tipo de variable
 - Cuantitativa Ordinal
 - Categoría de las variables
 - HER 0 no tiñe en menos del 10% de la membrana celular
 - HER 1+ Ligera o leve tinción en 10% de la membrana celular
 - HER 2+ Débil o moderada tinción en 10% de la membrana celular
 - HER 3+ Moderada a fuerte tinción en 10% de la membrana celular
 - HER 4+ Fuerte tinción membrana celular 10% de la me
 - Unidad de medición
 - Porcentaje de expresión celular
- SOBREVIDA GLOBAL :
 - Definición operativa
 - Periodo que transcurre desde la administración del tratamiento principal o en estudio hasta la última revisión o fallecimiento del paciente
 - Tipo de variable
 - Cuantitativa continua
 - Unidad de medición
 - Meses

- PERIODO LIBRE DE RECURRENCIA :
 - Definición operativa
 - Periodo que transcurre desde la administración del tratamiento principal o radical hasta la aparición de metástasis
 - Tipo de variable
 - Cuantitativa continua
 - Unidad de medición
 - Meses
- SEGUIMIENTO :
 - Definición operativa
 - Periodo que transcurre desde el diagnóstico hasta la última revisión médica
 - Cuantitativa continua
 - Unidad de medición
 - Meses
- MORTALIDAD :
 - Definición operativa
 - Tasa de defunciones o el número de defunciones en un grupo determinados de pacientes en un periodo de tiempo determinado
 - Cualitativa dicotómica
 - Categoría de las variables
 - Si
 - No

5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio es descriptivo, se realizó sin incurrir en violaciones al Código de Ética Internacional delineado en la declaración de Helsinki, revisado por la 58ª Asamblea de la Asociación Médica Mundial en Edimburgo, Escocia, en Octubre de 2000.

Debido a que esta investigación es considerada sin riesgos para los pacientes, en acuerdo con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, y por ser un estudio retrospectivo descriptivo, se considera un estudio sin riesgos para los pacientes, además se cuenta con el consentimiento del hospital para evaluar y analizar las muestras del laboratorio de patología.

6. RESULTADOS

Se revisaron los expedientes clínicos en el periodo comprendido desde enero del 2000 hasta junio del 2010, encontrándose 52 pacientes con muestras adecuadas de patología con un porcentaje mínimo (5%) de necrosis tumoral; sin embargo, 4 de estos pacientes fueron excluidos del estudio, 3 de ellos por no ser tratados médicamente en el Instituto Nacional de Cancerología, y un paciente presentó seguimiento insuficiente.

El sexo masculino fue predominante (32 pacientes; 66.7%), femeninos 16 pacientes (33.3%); edades comprendidas de 15-47 años con media de edad de 22.87 años, los laboratorios como exámenes complementarios, la LDH con media de 271.06 UI/L,

(rango:0-1706 UI/L), fosfatasa alcalina media 235.31 UI/L (rango:0-1692 UI/L); clínicamente observamos que el dolor fue el síntoma común en 39 pacientes (81.1%); signos como la masa palpable 20 pacientes (41.7%), impotencia funcional 17 pacientes (35.4%), deformidad 15 pacientes (31.3%), y fracturas patológicas solo en 9 pacientes (18.8%). La histología más frecuente fue el osteosarcoma osteoblástico 28 pacientes (58.3%), seguido de la variante fibroblástica en 5 pacientes (10.4%), condroblástico 4 pacientes (8.3%), convencional 3 pacientes (6.3%), osteogénico 3 pacientes (6.3%), telangectásico 1 paciente (2.1%) y mixtos 4 pacientes (8.3%), el grado de diferenciación en 37 paciente fue G3 (77.1%), G2 3 pacientes (6.3%), G1 8 pacientes (16.7%), las muestras obtenidas en su mayoría por resección quirúrgica en 37 pacientes (77.1%), biopsias 11 pacientes (22.9%); la localización más común en esta serie fue en fémur 30 pacientes (62.5%), seguida de tibia en 10 pacientes (20.9%), antebrazo 4 pacientes (8.4%), húmero 3 pacientes (4.2%), pelvis 1 paciente (2.1%), la ECIIB se presentó en 22 pacientes (45.8%), sucesivamente ECIII metastásica 15 pacientes (31.3%), ECIIA 6 pacientes (12.5%), ECIB 5 pacientes (10.4%).

Con respecto al tratamiento evidenciamos que la quimioterapia neoadyuvante se indicó en 25 pacientes (52.1%) con múltiples drogas siendo la más común doxorubicina y cisplatino sin toxicidad en 34 pacientes (70%), las complicaciones reportadas fueron las siguientes: toxicidad hematológica en 10 pacientes (20.8%) seguida de infecciosa en 2 pacientes (4.2%) y respuestas parciales en 23 pacientes (47.9%), los procedimientos quirúrgicos fueron muy similares en frecuencia, amputación 26 pacientes (54.2%), cirugía conservadora con reconstrucciones 21 pacientes (43.8%), sangrados con media 576.56 ml (rango: 0-2500 ml), sin complicaciones en 23 pacientes (47.9%); las complicaciones de los procedimientos quirúrgicos se presentaron en 25 pacientes (52.1%) de estos la más frecuente el síndrome de miembro fantasma en 9 pacientes (18.8%) e infecciosas 8 pacientes (16.6%), hemorrágicas 5 pacientes (10.4%), luxación de prótesis 1 paciente (2.1%), taponamiento cardiaco en 1 paciente (2.1%). En el tratamiento de consolidación la quimioterapia adyuvante se indicó en 34 pacientes (70.8%) con múltiples drogas como el etoposido e ifosfamida.

Las media en su seguimiento fue de 38.14 meses (rango: 3-90 meses), se evaluaron por clínica para la recaída local y estudios de imágenes para recaídas a distancia, de los cuales 31 pacientes presentaron metástasis (64.5%) de los siguientes 15 pacientes al diagnóstico (31.3%), durante el tratamiento 7 pacientes (14.6%), post-tratamiento 9 pacientes (18.8%); solo 17 pacientes no presentaron enfermedad a distancia (35.4%), localizándose el sitio más común en pulmón 23 pacientes (47.9%), el periodo libre de recurrencia, presentó una media de 25.66 meses (rango: 0-90 meses) y la sobrevida global se mantuvo con media de 31.45 meses (rango: 2-90 meses).

La sobrevida global a 3 años fue 69.2 %, a 5 años de 53.5% (Fig. 1), la mortalidad de nuestra serie fue de 20 pacientes (41.7%) durante el seguimiento.

Con respecto a la determinación de la proteína HER2 por IHQ, en nuestros resultados demostramos que no se expresó en el 100% en las muestras de pacientes con osteosarcomas, sin impacto en el periodo libre de recurrencia y sobrevida global.

En el análisis estadístico, solo la etapa clínica mostró ser significativamente estadístico en esta cohorte con $p < 0.01$, disminuyendo el periodo libre de recurrencia como factor pronóstico en los osteosarcomas.

Figura 1. Sobrevida global de pacientes con osteosarcoma

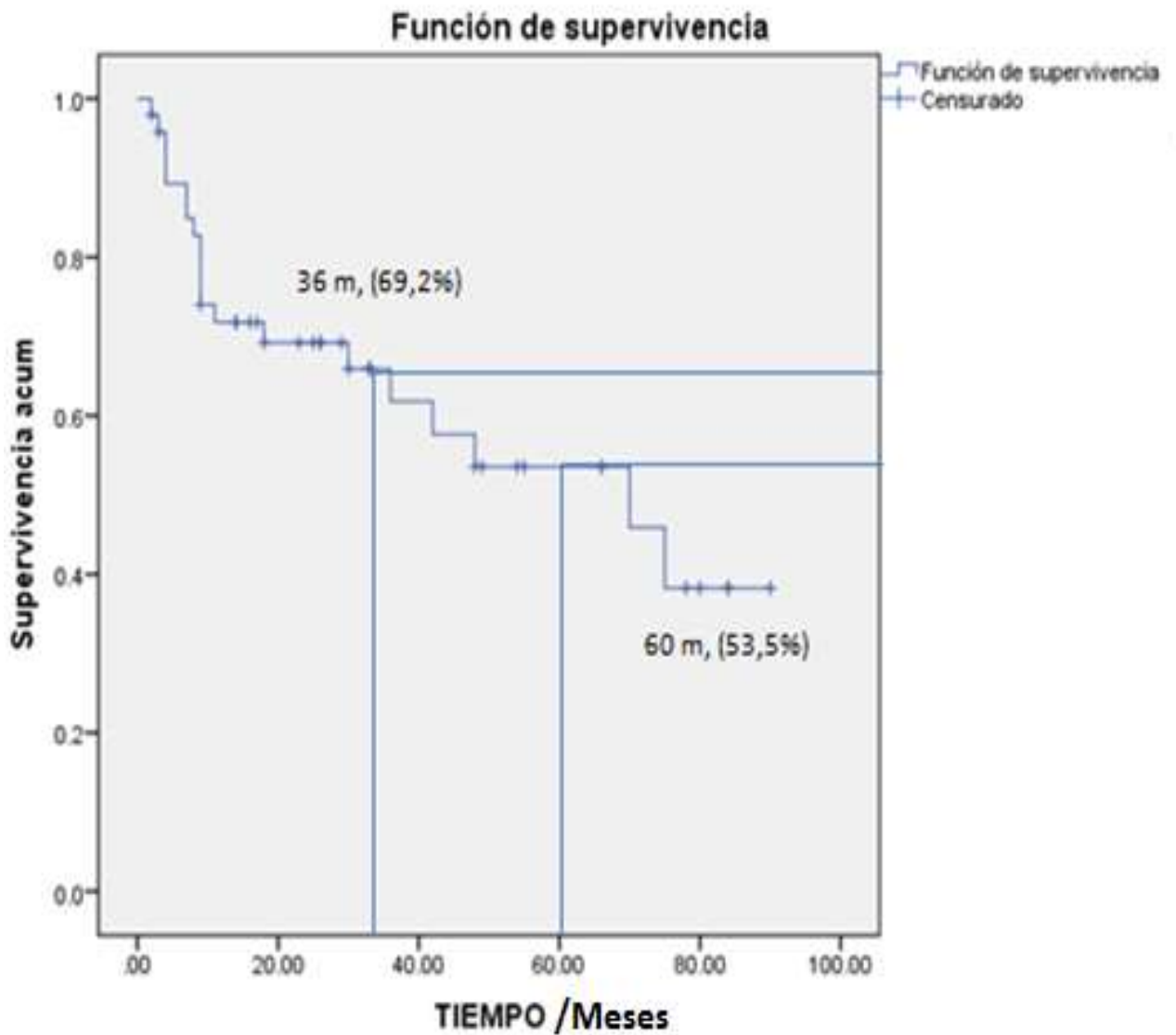
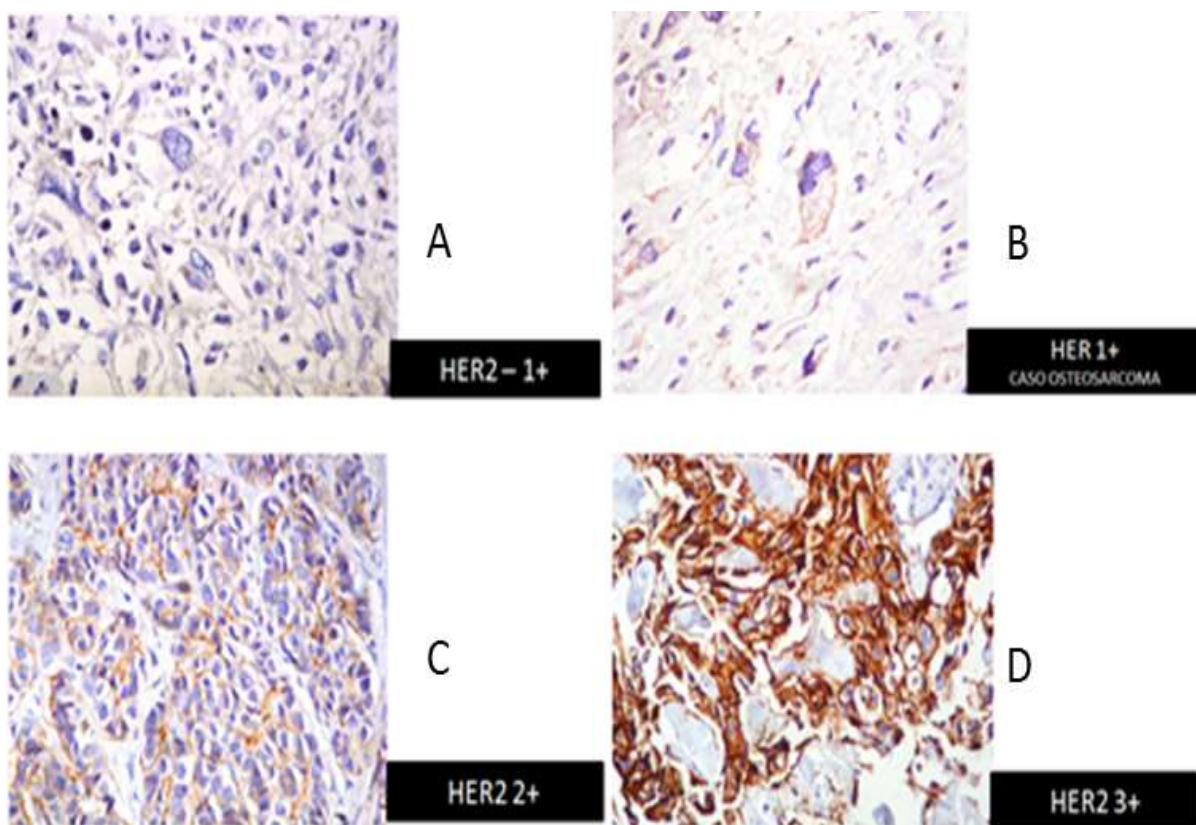


Figura 2. Detección de HER2 en muestras de osteosarcoma mediante inmunohistoquímica



7. DISCUSIÓN

Los osteosarcomas son las neoplasias de tejidos óseos más comunes representando aproximadamente el 56 % y el 15 % de todos los tumores sólidos extracraneales¹², de éstos el 30-40 % presentan mal pronóstico con enfermedad recurrente o metastásica³⁶.

Con la finalidad de mejorar la calidad de vida, la sobrevida global, el periodo libre de recurrencia, aparecen nuevas tendencias y enfoques médicos en los tratamientos de osteosarcomas^{37,38}, como las nuevas terapias biológicas dirigidas hacia HER2³⁹. Por lo que el objetivo de nuestro estudio fue determinar los niveles de la proteína HER2 mediante IHQ, y si esta proteína puede ser un biomarcador importante en los osteosarcomas con impacto en el pronóstico del paciente (periodo libre de enfermedad-sobrevida global).

Nuestros resultados mostraron que la expresión del HER 2 fue negativa en el 100% de los 48 pacientes con osteosarcomas, sin impacto en el periodo libre de recurrencia y sobrevida global.

En estos momentos existen múltiples discrepancias en la validez del HER2 y su sobreexpresión en tumores óseos como osteosarcomas. Onda y cols. fueron los primeros en investigar la expresión del HER en osteosarcoma (1996), analizando 26 pacientes con el anticuerpo monoclonal CBE1, presentando resultados con sobreexpresión de HER2 en 42% de los pacientes correlacionando con mal pronóstico clínicamente³⁰, sucesivamente Gorlick y cols. Reportaron la sobreexpresión de HER2 en un 42.6% y poca respuesta al tratamiento sistémico³¹. Otros autores como Akatsuka y cols, reportaron sobreexpresión de 61%³², Klemens y cols, de 40%³³. Sin embargo, Onda y cols, no demostraron la amplificación del gen HER2 por FISH³⁰.

En el 2002 Dafydd y cols, evaluaron pacientes con osteosarcoma y sarcomas de Ewing usando clonas A0485 policlonales de conejo y detectaron que el 44% presentó positividad en citoplasma pero no en membrana reportando que el HER2 no se sobreexpresa en estos tipos de tumores⁴⁰, sucesivamente se evaluaron 21 pacientes con osteosarcomas en población pediátrica, de los cuales ninguno sobre-expresó HER2 por IHQ utilizando clonas similares al estudio de Dafydd (A0485). Anirban Maitra y cols.⁴¹ en similitud a Kilpatrick S y cols. evaluaron 41 pacientes con osteosarcomas por medio de IHQ, H&E y FISH, sin evidencias de sobre-expresión del oncogén HER2, así como ninguna relación con el subtipo histológico, metástasis o sobrevida³⁴. Anninga y cols. tampoco observaron sobre-expresión del oncogén HER2 por IHQ, PCR y FISH, por lo cual sugieren que el HER2 no juega un papel importante en los osteosarcomas de

alto grado, además consideraron que los estudios anteriores al suyo que validan la sobreexpresión del HER2 no eran confiables, concluyendo que el anticuerpo monoclonal trastuzumab contra HER2 no es una terapia efectiva ante estos tumores óseos³⁵.

Existen algunas explicaciones para las diferencias entre los resultados encontrados en los estudios, incluidos el nuestro. Tal vez la más importante es el tipo de anticuerpo usado. En los estudios de Onda y cols. y de Gorlick y cols.^{30,31}, comparados con el nuestro, observamos el uso de diferentes anticuerpos anti HER2, encontrándose resultados muy diferentes en el nuestro y otros estudios reportados, haciendo mención que Press y cols. evaluaron el uso de 28 anticuerpos anti-HER2 en cáncer de mama (7 policlonales y 21 monoclonales) por IHQ en casos previamente positivos, con variaciones de 6 al 82 % de expresión del HER2 en su estudio⁴²

Además de que todos los estudios usan formalina para fijar el material a analizar, la descalcificación ósea previa a la fijación podría influir en el polémico tema de la puntuación en los resultados de IHQ; los detalles exactos de la puntuación de la IHQ y los criterios de puntuación no se encuentran explícitamente en los estudios de Onda y cols., la IHQ es una técnica de laboratorio de rutina reproducible, ofrece varias ventajas sobre otras pruebas que miden la expresión de proteína, sin embargo, su desventaja en los tejidos óseos puede estar influenciada por la fijación y la descalcificación previa de las muestras ya mencionada anteriormente, así como el grado de recuperación del antígeno y dependiente además del anticuerpo utilizado.

Adicionalmente existen diferencias metodológicas, histológicas, subtipos de osteosarcomas, localización, tratamientos previos, en los diferentes estudios reportados, que podrían influir en el análisis del estado de HER2.

8. CONCLUSIONES

Así, en contraste con estudios anteriores, nuestra investigación presenta una ausencia de la sobreexpresión del HER2 en los pacientes con osteosarcomas de extremidades y pelvis. Determinando que no es un factor pronóstico importante y que la terapia anti-HER2 con anticuerpo monoclonal no está indicada apropiada para estos pacientes.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Huvos A. Bone Tumors: Diagnosis, Treatment, Prognosis, 2nd, WB Saunders, Philadelphia 1991. pag 191-192
- 2) The WHO classification of bone tumors. Sissons HA. Recent Results Cancer Res. 1976, pag 121-123
- 3) McKenna, R, Schwinn, C, Soong, K, et al Sarcomas of the osteogenic series (osteosarcoma, chondrosarcoma, parosteal osteogenic sarcoma, and sarcomata arising in abnormal bone): an analysis of 552 cases, J Bone Joint Surg Am. 1966; 48:1. pag 2-3
- 4) Fletcher CDM, Unni K, Pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone, in Martens F, WHO. Lyon France: IARC PRESS 2002
- 5) Gurney JG, Swensen AR, Bulterys M. Malignant bone tumors. In: Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995 (Pub #99-4649), Ries LA, Smith MAS, Gurney JG, et al (Eds), SEER program, National Cancer Institute, Bethesda, MD 1999. p.99.
- 6) Data from the American Cancer Society <http://www.cancer.org/docroot/home/index.asp> (Accessed on June 03, 2012).
- 7) Smith MA, Gurney JG, Ries LA. Cancer in adolescents 15 to 19 years old. In: Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995 (Pub #99-4649), Ries LA, Smith MAS, Gurney JG, et al (Eds), SEER program, National Cancer Institute, Bethesda, MD 1999.
- 8) Stiller CA, Bielack SS, Jundt G, Steliarova-Foucher E. Bone tumours in European children and adolescents, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. Eur J Cancer. 2006; 42(13):2124.
- 9) Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA; Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, Program and Result. Cancer. 2009; 115(7):1531.
- 10) Base de datos de defunciones 2008. Sistema Epidemiológico y Estadístico de las Defunciones (SEED). Gobierno federal del estado de México
- 11) Rizo et al, Cancerología 2 (2007): 203-287
- 12) Stiller CA, Bielack SS, Jundt Et al .Bone tumors in European children and adolescent 1978-1997. Report form the automated childhood cancer information system project Eur J Cancer 2006; 42; 2124-2135
- 13) Kramárová E, Stiller CA; The international classification of childhood cancer. Int J Cancer. 1996; 68(6):759-760.
- 14) Hawkins MM, Wilson LM, Burton HS, Potok MH, Winter DL, Marsden HB, Stovall MA. Radiotherapy, alkylating agents, and risk of bone cancer after childhood cancer. J Natl Cancer Inst. 1996; 88(5):270-278.

- 15) Grimer RJ, Cannon SR, Taminiau AM, Bielack S, Kempf-Bielack B, Windhager R, Dominkus M, Saeter G, Bauer H, Meller I, Szendroi M, Folleras G, San-Julian M, van der Eijken J. Osteosarcoma over the age of forty., *Eur J Cancer*. 2003; 39(2):157.
- 16) Desai P, Perino G, Present D, Steiner GC; Sarcoma in association with bone infarcts. Report of five cases, *ArchPathol Lab Med*. 1996; 120(5):482.
- 17) Smith GD, Chalmers J, McQueen MM: Osteosarcoma arising in relation to an enchondroma. A report of three cases. *J Bone Joint Surg Br*. 1986;68(2):315.
- 18) Hauben EI, Arends J, Vandenbroucke JP, van Asperen CJ, Van Marck E, Hogendoorn PC; Multiple primary malignancies in osteosarcoma patients. Incidence and predictive value of osteosarcoma subtype for cancer syndromes related with osteosarcoma. *Eur J Hum Genet*. 2003; 11(8):611.
- 19) McIntyre JF, Smith-Sorensen B, Friend SH, Kassell J, Borresen AL, Yan YX, Russo C, Sato J, Barbier N, Miser J Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1994; 12(5):925.
- 20) Gorlick, R, Bielack, et al. Osteosarcoma: Biology, diagnosis, treatment, and remaining challenges. In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, 6th Ed, Pizzo, PA, Poplack, DG (Eds), Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia PA 2011. p.1015.
- 21) Buckley JD, Pendergrass TW, Buckley CM, Pritchard DJ, Nesbit ME, Provisor AJ, Robison LL; Epidemiology of osteosarcoma and Ewing's sarcoma in childhood: a study of 305 cases by the Children's Cancer Group., *Cancer*. 1998; 83(7):1440.
- 22) Troisi R, Masters MN, Joshipura K, Douglass C, Cole BF, and Hoover RN: Perinatal factors, growth and development, and osteosarcoma risk... *Br J Cancer*. 2006; 95(11):1603.
- 23) Hansen MF, Nellisery MJ, Bhatia P. Common mechanisms of osteosarcoma and Paget's disease. *J Bone Miner Res*. 1999;14 Suppl 2:39.
- 24) Nellisery MJ, Padalecki SS, Brkanac Z, Singer FR, Roodman GD, Unni KK, Leach RJ, Hansen MF. Evidence for a novel osteosarcoma tumor-suppressor gene in the chromosome 18 region genetically linked with Paget disease of bone. *Am J Hum Genet*. 1998; 63(3):817.
- 25) Kruzelock RP, Murphy EC, Strong LC, Naylor SL, Hansen MF. Localization of a novel tumor suppressor locus on human chromosome 3q important in osteosarcoma tumorigenesis., *Cancer Res*. 1997;57(1):106.
- 26) Yamaguchi T, Toguchida J, Yamamuro T, Kotoura Y, Takada N, Kawaguchi N, Kaneko Y, Nakamura Y, Sasaki MS, Ishizaki K. Allelotype analysis in osteosarcomas: frequent allele loss on 3q, 13q, 17p, and 18q. *Cancer Res*. 1992;52(9):2419.
- 27) Tarkkanen M, Karhu R, Kallioniemi A, Elomaa I, Kivioja AH, Nevalainen J, Böhling T, Karaharju E, Hyytinen E, Knuutila S. Gains and losses of DNA sequences in osteosarcomas by comparative genomic hybridization., *Cancer Res*. 1995;55(6):1334.
- 28) Duda RB, Cundiff D, August CZ, Wagman LD, Bauer KD. Growth factor receptor and related oncogene determination in mesenchymal tumors.. *Cancer*. 1993; 71(11):3526.

- 29) Hanna yong, HartmutK, Garcia R et al: Epidermal growth factor receptor in osteosarcoma: expression and mutational analysis, *H pathology* 2007, 38, 1184-1191.
- 30) Masanori Onda, Satoru Matsuda, ErbB-2 Expression Is Correlated with Poor Prognosis For Patients with Osteosarcoma, *CANCER* January 1, 1996 / Volume 77 / Number 1
- 31) Richard Gorlick, Andrew G, GlennH. Expression of HER2/erb-2 Correlates with survival in osteosarcoma .*Journal ClinOnco*: Vol17, No 9 September, 1999, 2781-2788.
- 32) AkatsukaT, Takuro W, Yasuo K et al: ErbB2 expression is correlated with increased survival of patient with osteosarcoma: *Cancer* march 1, 2002, volume 94 numbers 5, 1397-1404.
- 33) Klemens T, KotzR, Proteins expressed in osteosarcoma and serum levels as prognostic factors: the *Int J Bioche&cell Biology*; 33, 2001; 11-17.
- 34) Kilpatrick S, Kim G, King T Et al: Clinicopathologic Analysis of HER2/neuimmunoexpression among various histologic subtypes and grades of osteosarcoma: *Mod Pathol* 2001; 14(12)1277-1283.
- 35) J.KAnninga M.J Van M, A.M Clenson et al: Overexpression of the HER-2 oncogen does not play a role in high-grade osteosarcomas: *Eur J Canc*: 40; 2004:963-970
- 36) Marulanda GA, Henderson ER, Johnson DA, LetsonGD, Cheong D. Orthopedic surgery options for the treatment ofprimary osteosarcoma. *Cancer Control* 2008; 15: 13-20.
- 37) Lamoureux F, Trichet V, Chipoy C, Blanchard F, GouinF,Redini F. Recent advances in the management of osteosarcoma and forthcoming therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7: 169-181.
- 38) Sakamoto A, Iwamoto Y. Current status and perspectives regarding the treatment of osteosarcoma: chemotherapy. *Rev Recent Clin Trials* 2008; 3: 228-231.
- 39) Dowsett M, Hanna WM, Kockx M, Penault-LlorcaF, Rüschoff J, and Gutjahr T, et al. Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. *Mod Pathol* 2007; 20: 584-591.
- 40)Dafydd G. Thomas,Thomas J. Giordano,Donita Sanders, J. Sybil Biermann, and Laurence Baker .Absence of HER2/neuGene Expression in Osteosarcoma and Skeletal Ewing's Sarcoma;. *Clinical Cancer Research*; Vol. 8, 788–793, March 2002
- 41) AnirbanMaitra, .Dana Wanzer, Arthur G. Weinberg, .RaheelaAshfaq, Amplification of the HER-2/neu Oncogene Is Uncommon in Pediatric Osteosarcomas; *cancer*. August 1, 2001, volume 92, number 3
- 42) Press, M. F., Hung, G., Godolphin, W., and Slamon, D. J. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res.*, 54: 2771–2777, 1994.
- 43) Pauletti, G., Dandekar, S., Rong, H., Ramos, L., Peng, H., Seshadri, R., and Slamon, D. J. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER-2/neu alteration in human breast cancer: a direct comparison of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *J. Clin. Oncol.* 18: 3651–3664, 2000.

