



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

DIEGO FRANCIEL MARQUES MÜHLBEIER

**Análise imuno-histoquímica de marcadores apoptóticos Bcl-2 e
Bax em sarcomas de partes moles de extremidades: um estudo
de microarranjos de tecidos**

Dissertação de Mestrado

Goiânia
2012

DIEGO FRANCIEL MARQUES MÜHLBEIER

Análise imuno-histoquímica de marcadores apoptóticos Bcl-2 e Bax em sarcomas de partes moles de extremidades: um estudo de microarranjos de tecidos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Co-orientador: Prof. Dr. Wilmar José Manoel

Goiânia
2012

M952a Mühlbeier, Diego Franciel Marques.
Análise imuno-histoquímica de marcadores apoptóticos Bcl-2 e Bax em sarcomas de partes moles de extremidades : um estudo de microarranjos de tecidos [manuscrito] / Diego Franciel Marques Mühlbeier. – 2012.
66 f. : il. colors.

Bibliografia: f. 54-62
Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2012.
Orientadora: Profª Drª. Vera Aparecida Saddi.
Co-orientador: Prof. Dr. Wilmar José Manoel.
Inclui lista de figuras, tabelas, abreviaturas.
Inclui Anexos.

1. Sarcomas. 2. Partes moles de extremidades – sarcomas.
3. Apoptose. 4. Proteína Bcl2. 5. Proteína Bax. I. Título.
CDU: 616-006.3.04(043.3)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário
Caixa Postal 86 ● CEP 74605-010
Goiânia ● Goiás ● Brasil
Fone: (62) 3946.1070 ● Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br ● prope@pucgoias.edu.br

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DEFENDIDA EM 12 DE MARÇO DE 2012 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA**

50,0 (Dez)

Vera Aparecida Saddi

Profª Drª Vera Aparecida Saddi - PUC Goiás
(presidente-orientadora)

Wilmar José Manoel

Prof.º Dr. Wilmar José Manoel / ACCG
(coorientador)

Luís de Paula Silveira Júnior

Prof. Dr. Luís de Paula Silveira Júnior / PUC Goiás
(membro interno)

Flávio Monteiro Ayres

Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres / UEG
(membro externo)

Dedico este trabalho...

A todos os meus familiares e pessoas intimamente ligadas à minha vida, em especial aos meus pais, Arno Mühlbeier e Margareth Aparecida Marques, pelo apoio incondicional e por tornarem possível a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, fé e bênçãos que tem me proporcionado durante todas as minhas lutas.

Aos meus pais e a minha irmã, Bruna, não só pelo apoio e incentivo que sempre me deram durante minha trajetória, mas principalmente pela amizade, carinho e dedicação. Obrigado por todos os esforços e sacrifícios durante toda minha formação acadêmica e por estarem do meu lado em todos os momentos da minha vida.

À uma pessoa especial: Ro. Muito obrigado por dividir todas as angústias, preocupações e momentos de tensões durante toda minha trajetória acadêmica. Agradeço pelo apoio, dedicação e por ter tornado esses desafios menos árduos pelo simples fato de estar ao meu lado.

À Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi por ter não só me proporcionado a honra de ser seu orientando, mas também por ser a grande fonte de inspiração para que eu ingressasse nesse universo da ciência. Obrigado por todos os momentos de aprendizados, convivência e amizade ao longo desses anos de muitos desafios científicos.

Ao Prof. Dr. Wilmar José Manoel pela ajuda essencial para a realização desse trabalho e por ter sido o grande mentor e idealizador desse projeto. Obrigado pelos valiosos ensinamentos e dedicação, além da grande parceria e amizade ao longo desse e dos outros projetos que desenvolvemos.

A toda equipe da Fundação Hemocentro de Brasília, em especial a Ana Clara, José Pedro, Dr. Marcelo, Dr^a. Franciele, Fabíola e Érika pela colaboração e

compreensão para que eu desenvolvesse esse projeto e pelos esforços desempenhados na minha ausência.

Ao Dr. Élbio Cândido de Paula e toda equipe do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge pela importante colaboração e fundamental contribuição na coleta de dados e análise patológica dos casos.

À equipe do Setor de Tecido Conjuntivo do Hospital Araújo Jorge pelo atendimento e assistência aos pacientes do estudo.

À Dr^a. Isabela Werneck Cunha e toda equipe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo pelo apoio e colaboração indispensável na execução técnica desse trabalho.

Ao Dr. José Humberto Fregnani pelo importante suporte estatístico do trabalho.

Aos professores e colegas do Programa de Mestrado em Genética pelas trocas de informações, conhecimentos e experiências no decorrer do curso.

Aos funcionários do Programa de Mestrado em Genética, em especial ao Renato, por todo o suporte e ajuda prestada durante o curso.

Ao pessoal da Universidade de Brasília, professores e colegas, pelo acolhimento e pelas esplêndidas aulas e discussões científicas, que contribuíram de maneira expressiva na minha formação acadêmica.

À PUC-GO pela estrutura e pelas condições propiciadas ao desenvolvimento desse e outros projetos.

E aos pacientes que participaram desse estudo, sem os quais nada disso seria possível.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Sistema de descrição do estágio, grau e metástases linfonodais e à distância (TNM)..... | 17 |
| Figura 2 Mecanismos gerais da apoptose | 22 |
| Figura 3 Construção do microarranjo de tecido (TMA)..... | 27 |

TABELAS E FIGURAS DO ARTIGO

| | |
|--|----|
| Table 1 Characteristics of antibodies used in immunohistochemical analysis | 48 |
| Table 2 Association between clinicopathological parameters and Bcl-2 and Bax expression in soft tissue sarcoma of extremities | 49 |
| Table 3 Association between Bcl-2 and Bax expression in soft tissue sarcoma of extremities | 50 |
| Figure 1 Kaplan-Meier overall survival curve of patients with soft tissue sarcomas of extremities. | 51 |
| Figure 2 Kaplan-Meier analyses of overall survival according to histological grade..... | 51 |
| Figure 3 Kaplan-Meier analyses of overall survival according to stage | 52 |
| Figure 4 Kaplan-Meier analyses of overall survival according to Bcl-2 expression | 52 |
| Figure 5 Kaplan-Meier analyses of overall survival according to Bax expression..... | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| ACCG | Associação de Combate ao Câncer em Goiás |
| AIDS | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| AJCC | <i>American Joint Committee on Cancer</i> |
| APAF-1 | do inglês: <i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i> |
| Bax | proteína pró-apoptótica |
| Bcl-2 | proteína anti-apoptótica |
| BCL-2 | proto-oncogene anti-apoptótico |
| CEPACCG | Comitê de Ética em Pesquisas da Associação de Combate ao Câncer em Goiás |
| CI | do inglês: <i>Confidence Interval</i> (Intervalo de confiança) |
| CLTC : ALK | produto de fusão gênica |
| COL1A1 : PDGFB | produto de fusão gênica |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| ETV6 : NTRK3 | produto de fusão gênica |
| EWS : ATF1 | produto de fusão gênica |
| EWS : FLI1 | produto de fusão gênica |
| EWS : ERG | produto de fusão gênica |
| EWS : ETV1 | produto de fusão gênica |
| EWS : E1AF | produto de fusão gênica |
| EWS : FEV | produto de fusão gênica |
| EWS : NR4A3 | produto de fusão gênica |
| EWS : DDIT3 | produto de fusão gênica |
| FAS/CD95 | receptor apoptótico da via extrínseca da apoptose |
| FISH | do inglês: <i>Fluorescence in situ Hybridization</i> (Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência) |
| FUS : ATF1 | produto de fusão gênica |
| FUS : DDIT3 | produto de fusão gênica |
| FUS-CHOP | produto de fusão gênica |
| FUS : CREB3L2 | produto de fusão gênica |
| FUS : CREB3L1 | produto de fusão gênica |
| GI | grau 1 |

| | |
|----------------------|--|
| GII | grau 2 |
| GIII | grau 3 |
| GIV | grau 4 |
| JAZF1 : JJAZ1 | produto de fusão gênica |
| HAJ-ACCG | Hospital Araújo Jorge da ACCG |
| HR | do inglês: <i>Hazard Ratio</i> |
| IHC | imuno-histoquímica |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| KIT | gene relacionado a tumores estromais gastrointestinais |
| Myc | proteína envolvida na proliferação celular e apoptose |
| mRNA | RNA mensageiro |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OS | do inglês: <i>Overall Survival</i> (Sobrevida Global) |
| p53 | proteína 53 |
| PAX3 : FOXO1A | produto de fusão gênica |
| PAX7 : FOXO1A | produto de fusão gênica |
| PBS | tampão fosfato |
| PCR | do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase) |
| RANBP2 : ALK | produto de fusão gênica |
| RNA | ácido ribonucleico |
| RBP56 : NR4A3 | produto de fusão gênica |
| RCBP-GO | Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia |
| SING | do inglês: <i>Size, Invasion, Necrosis, Growth</i> |
| SPM | Sarcoma de Partes Moles |
| SPSS | do inglês: <i>statistical software package</i> |
| SS18 : SSX1 | produto de fusão gênica |
| SS18 : SSX2 | produto de fusão gênica |
| SS18 : SSX4 | produto de fusão gênica |
| STS | do inglês: <i>Soft Tissue Sarcomas</i> |
| SYT-SSX | produto de fusão gênica |
| TCF12 : NR4A3 | produto de fusão gênica |
| TFE3 : ASPL | produto de fusão gênica |

| | |
|-------------------|--|
| TMA | do inglês: <i>Tissue Microarray</i> (Microarranjos de Tecidos) |
| TNF | do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral) |
| TNM | Sistema de Estadiamento de Tumores Malignos |
| TPM3 : ALK | produto de fusão gênica |
| TPM4 : ALK | produto de fusão gênica |
| UICC | do francês: <i>Union Internationale Contre le Cancer</i> |
| USA | <i>United States of America</i> (Estados Unidos da América) |
| UV | Ultravioleta |

SUMÁRIO

| | pág. |
|---|------|
| RESUMO..... | xii |
| ABSTRACT | xiii |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 Sarcomas de partes moles – características gerais..... | 14 |
| 1.2 Sarcomas de partes moles – características epidemiológicas..... | 17 |
| 1.3 Sarcomas de partes moles – características genéticas | 18 |
| 1.4 Sarcomas de partes moles e os marcadores apoptóticos Bcl-2 e Bax | 20 |
| 1.5 Microarranjos de Tecidos (TMA)..... | 24 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 28 |
| 3 OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 29 |
| 3.2 Objetivos específicos | 29 |
| 4 PUBLICAÇÃO | 30 |
| 4.1 Artigo a ser submetido à <i>Human Pathology</i> | 30 |
| 5 CONCLUSÕES | 54 |
| 6 REFERÊNCIAS..... | 55 |
| 7 ANEXOS | 64 |
| 7.1 Anexo 1 - Classificação de Sarcomas de Partes Moles Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) | 64 |
| 7.2 Anexo 2 - Translocações cromossômicas comumente encontradas em sarcomas de partes moles..... | 65 |
| 7.3 Anexo 3 - Ficha de coleta de dados clínico-patológicos de SPM – Hospital Araújo Jorge - ACCG | 66 |
| 7.4 Anexo 4 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (CEPACCG)..... | 67 |

RESUMO

Os sarcomas constituem um grupo heterogêneo de tumores que surgem a partir de tecidos mesenquimais e que representam cerca de 1% de todos os tumores sólidos malignos diagnosticados em adultos. Alterações que afetam o crescimento tumoral, como a desregulação da apoptose, por meio da hiperexpressão de proteínas da família Bcl-2, têm sido associadas ao prognóstico dos pacientes em diversos tipos de cânceres, incluindo os sarcomas de partes moles (SPM). A família Bcl-2 inclui proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, tais como as proteínas Bax e Bcl-2, respectivamente. Apesar das evidências, o valor prognóstico dessas proteínas, assim como a associação com fatores clínico-patológicos, ainda permanecem controversos. O objetivo desse estudo foi investigar o significado clínico da via da apoptose, por meio da avaliação da expressão imuno-histoquímica de Bcl-2 e Bax, em um grupo de 86 casos de SPM de extremidades, utilizando microarranjos de tecidos (*tissue microarray*). A expressão citoplasmática de Bcl-2 e Bax foi detectada em 25,9% e 66,7% dos casos, respectivamente. A hiperexpressão de ambos, Bcl-2 e Bax, foi associada aos sarcomas sinoviais, ao grau histológico e ao estadiamento clínico. Uma associação significativa entre a expressão das proteínas Bcl-2 e Bax também foi observada. A sobrevida global em cinco anos foi de 57%, sendo menor para os casos com hiperexpressão de Bcl-2 (47,6% x 58,3%) e Bax (50% x 66,7%), porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Após análise multivariada, o grau histológico apresentou-se como fator prognóstico independente ($p = 0.043$, HR = 8.0, IC 95%, 1.1-60.1). Proteínas da família Bcl-2 vêm sendo testadas como alvos terapêuticos em diversos estudos clínicos em vários tipos de cânceres. Em nosso estudo, a expressão de Bcl-2 e Bax foi associada com o grau histológico e o estadiamento clínico, que são fatores clássicos de mau prognóstico. Assim, sugerimos o uso da expressão imuno-histoquímica de Bcl-2 e Bax como potencial marcador prognóstico em SPM de extremidades, possibilitando um planejamento terapêutico mais adequado para cada caso.

Palavras-chave: Sarcomas de partes moles; Apoptose; Bcl-2; Bax; Prognóstico.

ABSTRACT

Sarcomas are a heterogeneous group of tumors that arise from mesenchymal tissues which represent about 1% of all diagnosed solid malignant tumors in adults. Changes that affect the tumor growth such as the deregulation of apoptosis, through overexpression of the Bcl-2 family proteins, have been associated with the prognosis of patients in various types of cancers, including soft tissue sarcomas (SPM). The Bcl-2 family proteins include anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins such as proteins Bcl-2 and Bax, respectively. Despite the evidence, the prognostic value of these proteins, as well as the association with clinicopathological factors, remain controversial. The objective of this study was to investigate the clinical significance of the expression of apoptosis-related markers Bcl-2 and Bax in 86 patients with STS of extremities by immunohistochemical analysis on a tissue microarray construction. Cytoplasmic expression of Bax and Bcl-2 was detected in 25.9% and 66.7% of the cases, respectively. Overexpression of both Bcl-2 and Bax was directly associated with synovial sarcoma, histological grade and clinical stage. A significant association between Bax and Bcl-2 expression was also observed. The 5-year overall survival (OS) for the group was 57%, being lower for cases with Bcl-2 overexpression (47.6% vs 58.3%) and Bax overexpression (50% vs 66.7%), although such difference was not significant. After multivariate analysis, the histological grade remained as an independent prognostic factor ($p=0.043$, HR=8.0, 95% CI, 1.1-60.1). Bcl-2 family proteins have been tested as therapeutic targets in some clinical studies in several cancers. In our study, overexpression of both Bcl-2 and Bax was associated with histological grade and clinical stage of the tumors, which are classical factors of poor prognosis. Thus, we suggest the use of these proteins as potential prognostic markers in STS of extremities, providing a more appropriate therapeutic planning for each patient.

Keywords: Soft tissue sarcomas; Apoptosis; Bcl-2; Bax; Prognostic.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sarcomas de partes moles – características gerais

Partes moles são definidas como tecido não epitelial extra-esquelético incluindo músculos, vasos sanguíneos e linfáticos, tecido adiposo e estruturas fibrosas de suporte, originando-se principalmente do mesoderma, com alguma contribuição neuroectodérmica (MANOEL et al., 1988; CLARK et al., 2005a).

Os sarcomas de partes moles (SPM) podem originar-se em qualquer área do corpo, sendo que 40% ocorrem em membros inferiores e cintura pélvica, 20% em membros superiores e cintura escapular, 20% em região retroperitoneal e intraperitoneal, 10% em tronco e 10% em cabeça e pescoço (LATORRE e FRANCO, 1999; SINGER et al., 2000; JEMAL et al., 2004). Os SPM não apresentam sintomas clínicos específicos para o diagnóstico. O achado mais comum é de uma massa indolor de crescimento gradual. O tamanho do tumor no momento do diagnóstico varia de acordo com a localização. Tumores distais dos membros e de cabeça e pescoço são geralmente menores devido à possibilidade de serem notados mais precocemente, enquanto que tumores da coxa e do retroperitônio podem atingir grandes dimensões até serem detectados. Os SPM se expandem de uma maneira centrífuga, infiltrando a pseudocápsula tumoral e estruturas adjacentes. Desta maneira, podem apresentar sintomas sítio-dependentes, tais como, parestesia, dor, edema distal ou sintomas relacionados aos órgãos intra-cavitários (CLARK et al., 2005a) .

O crescimento dos SPM varia com a agressividade do tumor. Os sarcomas de baixo grau podem evoluir por um longo período e serem confundidos com

tumores benignos, especialmente lipomas. Tal situação pode levar a uma demora do paciente na procura por centros especializados. A identificação dos SPM requer exame clínico, exames de imagem e análise histopatológica. Os exames de imagem são usados para definir o tamanho do tumor e a sua relação com as estruturas adjacentes (RYDHOLM, 1998).

A confirmação diagnóstica dos SPM é feita por meio de análise histopatológica. A biópsia percutânea com agulha grossa (*core biopsy*) é um procedimento seguro, efetivo e pode ser realizado com anestesia local em pacientes ambulatoriais com tumores em membros superiores e inferiores. O sítio da biópsia deve ser escolhido de maneira que se situe na área de uma possível subsequente ressecção em bloco do tumor. O subtipo e o grau do tumor podem ser determinados em 80% dos casos submetidos a esse procedimento (MANKIN et al., 1996; HESLIN et al., 1997).

A sobrevida dos pacientes portadores de sarcomas de partes moles varia de acordo com o tipo histológico, sua localização, estadiamento ao diagnóstico e com as margens cirúrgicas alcançadas durante a cirurgia (JEMAL et al., 2004). O modelo prognóstico para sarcoma de partes moles de extremidades e do tronco foi proposto por Carneiro et al. (2011), em que o tamanho do tumor, a invasão vascular, o grau de necrose e o padrão de crescimento referido como SING (*Size, Invasion, Necrosis, Growth*) foi comparado com outros sistemas clínicos de avaliação prognóstica. Essas características representam fatores prognósticos independentes para o desenvolvimento de metástases após análise multivariada.

As taxas de sobrevida global em 5 anos para os estágios I, II, III e IV são de aproximadamente 90, 70, 50 e de 10 a 20%, respectivamente, variando de acordo com o tipo histológico, a localização, o tamanho, o grau e os outros fatores

inerentes ao tumor (PISTERS et al., 1994; STOJADINOVIC et al., 2002). Nas lesões de extremidades, a taxa de sobrevida em 10 anos varia de 55%, para pacientes com lesões de alto grau histológico, a 90% para os de baixo grau (BORDEN et al., 2003).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu cerca de 50 tipos relevantes de SPM que são nominados de acordo com os tecidos aos quais mais se assemelham (Anexo 1) (FLETCHER et al., 2002). Um sistema de graduação em três graus é aconselhado pela *French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group*, amplamente utilizado e leva em conta o grau de diferenciação, o número de mitoses e a extensão de necrose do tumor. Sistemas de graduação em quatro graus são também utilizados. Esta graduação deve ser feita de preferência antes da terapia adjuvante, pois é difícil a classificação do grau dos tumores quando previamente tratados com radioterapia, com quimioterapia e os tumores recidivados (GREENE et al., 2002).

Atualmente, o tratamento dos sarcomas de partes moles é norteado pelo grau histológico e pela adequação das margens cirúrgicas. Os sarcomas de baixo grau são caracterizados por uma velocidade de crescimento menor, baixo risco de metástase à distância e por uma longa sobrevida, sendo o principal objetivo do tratamento o seu controle local (MANOEL et al., 2008).

A determinação do estágio de um tumor permite ao médico estimar o prognóstico da doença. O sistema de estadiamento aconselhado pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e pela *International Union Against Cancer (UICC)* (Figura 1) (GREENE et al., 2002; UICC, 2002) combina os mais importantes determinantes da sobrevida em SPM: o grau, a profundidade, o tamanho do tumor, o comprometimento linfonodal e a presença de metástases à

distância. Estudos confirmam que o grau e o tamanho dos SPM são de similar importância prognóstica (PISTERS et al., 1996; RAMANATHAN et al., 1999). Nesses estudos, tumores GI e GII foram classificados como de baixo grau e tumores GIII e GIV como de alto grau.

| Grau e TNM | Descrição | | T1a | T1b | T2a | T2b |
|------------|--|----------|-------------------------|---------|-----|-----|
| | | | Estágio | | | |
| G1 | Bem diferenciado | | | | | |
| G2 | Moderadamente diferenciado | G1 ou G2 | IA | | IB | IIA |
| G3 | Pobrememente diferenciado | G3 ou G4 | IIB | | IIC | III |
| G4 | Indiferenciado | N1 | IV | | | |
| T1 | Tumor ≤ 5cm em sua maior dimensão | M1 | | | | |
| T1a | Superficial à fascia profunda | | | | | |
| T1b | Profundo à fascia profunda que inclui: Retroperitônio, intratorácico e a maioria de cabeça e pescoço | | | | | |
| T2 | Tumor > 5cm em sua maior dimensão | | <u>Sobrevida 5 anos</u> | | | |
| T2a | Superficial à fascia profunda | | Estágio | % | | |
| T2b | Profundo à fascia profunda que inclui: Retroperitônio, intratorácico e a maioria de cabeça e pescoço | | I | 86 | | |
| | | | II | 72 | | |
| N1 | Linfonodos regionais metastáticos | | III | 52 | | |
| M1 | Metástases à distancia | | IV | 10 - 20 | | |

Figura 1. Sistema de descrição do estágio, grau e metástases linfonodais e à distância (TNM). Classificação segundo o *Committee on Cancer for Soft-tissue Sarcoma* e a *International Union Against Cancer* (Adaptado de: Greene et al. 2002).

1.2 Sarcomas de partes moles – características epidemiológicas

Os SPM compõem um grupo heterogêneo de neoplasias malignas, com diferentes padrões morfológicos. Representam cerca de 1% das neoplasias malignas dos pacientes adultos. Apesar de apresentarem um pico de incidência na infância, são mais comuns na idade adulta, especialmente em maiores de 50 anos (SINGER et al., 2001). Aproximadamente 10.520 novos casos são diagnosticados anualmente nos Estados Unidos (JEMAL et al., 2010) e cerca de 1.500 no Reino Unido (JEMAL et al., 2004).

Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), os sarcomas são encontrados em todas as faixas etárias, apresentando uma prevalência de 0,7 a 1,0% dentre todas as neoplasias (MARTIN, 1976; INCA, 2006). Em Goiânia, segundo o Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia (RCBP-GO), em 2008, a incidência no sexo masculino foi de 1,54 por 100.000 habitantes, equivalendo a 0,43% do total das neoplasias do sexo masculino. No sexo feminino, 1,85 por 100.000 habitantes, correspondendo a 0,52% das neoplasias em mulheres (RCBPGO, 2008). O aumento da incidência global dos sarcomas pode ser parcialmente justificado pelo aumento do número de casos de Sarcoma de Kaposi, associado à Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (ZAHM et al., 1997; LEVI et al., 1999). A incidência relativamente baixa, a diversidade histopatológica, a variedade de sítios anatômicos e seu comportamento biológico fazem desses tumores entidades de difícil diagnóstico e de difícil tratamento. Mais de 50% dos pacientes diagnosticados com sarcomas de partes moles vão a óbito, em decorrência da doença, num período de cinco anos. Quando diagnosticados em estágios iniciais, o índice de cura é alto, ao contrário da doença metastática onde a cura é rara (JEMAL et al., 2003; CLARK et al., 2005b).

Novas perspectivas em relação à melhor compreensão dos sarcomas e à consequente melhora dos métodos diagnósticos e de tratamento têm surgido com os estudos de biologia molecular.

1.3 Sarcomas de partes moles – características genéticas

Diversas evidências sugerem que os sarcomas podem ser divididos em dois grandes grupos genéticos: (1) sarcomas com alterações genéticas específicas e cariótipos geralmente simples, como translocações cromossômicas recíprocas

(por exemplo, FUS-DDIT3 em liposarcoma mixóide) e mutações oncogênicas específicas (por exemplo, mutação no gene *KIT* em tumores estromais gastrointestinais); (2) sarcomas com alterações genéticas não específicas e cariótipos complexos (ANTONESCU, 2006).

Muitos tipos de sarcomas são caracterizados pela presença de produtos de fusões gênicas específicas que permitem o diagnóstico preciso do tumor, como o sarcoma sinovial (SYT-SSX), sarcoma de Erwing (EWS-Fli1), sarcoma de células claras (EWS-ATF1), liposarcoma mixóide (FUS-CHOP) e outros (Anexo 2) (MIETTINEN, 2006).

Os SPM com perfis genéticos complexos, cerca de 50% de todos os casos de SPM, são predominantemente representados por sarcomas pleomórficos caracterizados pelo ganho ou perda de cromossomos ou regiões cromossômicas, assim como amplificações gênicas. Muitas dessas aberrações recorrentes têm um papel significativo na progressão tumoral e/ou disseminação metastática (GUILLOU e AURIAS, 2010).

Algumas dessas anormalidades genéticas, incluindo mudanças cromossômicas numéricas, translocações, amplificações gênicas ou extensas deleções podem ser detectadas por métodos citogenéticos, por meio da cariotipagem ou Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH: do inglês, *fluorescence in situ hybridization*), enquanto outras, tais como pequenas deleções, inserções ou mutações pontuais, exigem técnicas moleculares específicas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR: do inglês, *polymerase chain reaction*) e o sequenciamento de DNA (ANTONESCU, 2006).

Novas metodologias vêm sendo utilizadas para avaliação da expressão gênica em SPM. Isso tem auxiliado na classificação molecular desses tumores, assim como no desenvolvimento de novos marcadores diagnósticos e terapêuticos. Estudos proteômicos, utilizando eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, têm gerado novas informações importantes sobre o desenvolvimento e progressão tumoral, marcadores diagnósticos, classificação e tratamentos dos SPM (MADOZ-GÚRPIDE, 2009; SUEHARA, 2011). De forma semelhante, estudos de análise de expressão gênica em larga escala, utilizando *microarrays*, têm gerado importantes informações acerca de possíveis marcadores relacionados à patogênese tumoral, além de alvos terapêuticos e marcadores preditivos e prognósticos em sarcomas (BAIRD et al., 2005; TSCHOEP et al., 2007; CARNEIRO et al., 2009).

Sabe-se que o crescimento tumoral depende de duas vias distintas: proliferação celular e apoptose. Vários marcadores de proliferação celular e de apoptose são utilizados para determinar a progressão tumoral e/ou a resposta terapêutica em diversos tipos de cânceres, inclusive os SPM. Os principais marcadores apoptóticos pesquisados são as proteínas da família Bcl-2, que devido a sua importância, têm sido alvo de diversos estudos pré-clínicos e clínicos na área da oncologia (CHIPUK et al., 2010; AZMI et al., 2011; BAJWA et al., 2012).

1.4 Sarcomas de partes moles e os marcadores apoptóticos Bcl-2 e Bax

A morte celular programada ou apoptose é controlada por proteínas da família Bcl-2, que incluem proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas, tais como

Bcl-2 e Bax, respectivamente. Bcl-2 e Bax são proteínas citoplasmáticas que atuam na mitocôndria promovendo ou inibindo a apoptose (CHIPUK et al., 2010).

A apoptose pode ser desencadeada a partir de estímulos extracelulares via ligação de moléculas pró-apoptóticas a receptores de membranas, como TNF (*Tumor Necrosis Factor*) ou FAS/CD95 (via extrínseca), ou a partir de sinais de *stress* gerados dentro de célula, tais como danos ao DNA, privação de nutrientes e hipóxia (via intrínseca ou mitocondrial) (CHIPUK et al., 2010). As duas vias levam à ativação de caspases, que promoverão de maneira efetiva a apoptose.

As proteínas da família Bcl-2 atuam na via intrínseca da apoptose. Essa via é iniciada pela permeabilização da membrana mitocondrial externa, o que permite a difusão de proteínas solúveis, como o citocromo *c*, para o citosol. O citocromo liberado após o estímulo apoptótico, liga-se a APAF-1 (*Apoptotic Protease Activating Factor-1*), que promove a ativação da caspase-9 iniciadora, em um complexo multimolecular denominado apoptossomo. A caspase-9 ativa então as caspases-3 e -7 efetoras, que clivam substratos celulares para promover o fenótipo apoptótico (RIEDL e SALVESEN, 2007) (Figura 2).

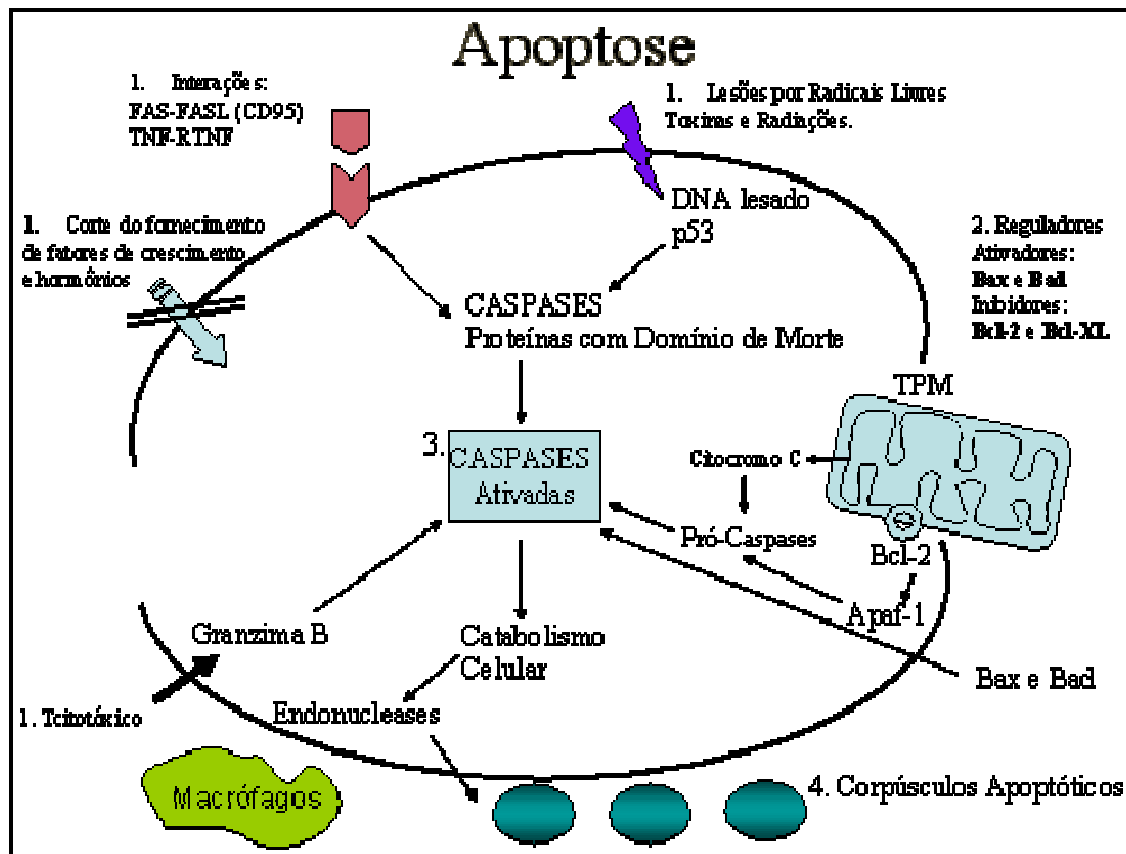


Figura 2. Mecanismos gerais da apoptose. A ativação da apoptose pode ocorrer a partir de *stress* interno ou sinal apoptótico externo. Uma sequência de sinais extracelulares e/ou intracelulares induzem a morte celular programada, por exemplo, a ligação de fatores pró-apoptóticos a receptores transmembranares (FAS ou TNF), defeito no reparo do DNA celular, drogas citotóxicas ou irradiações, privação nutricional, etc. O estímulo pró-apoptótico induz a ativação das caspases. As caspases iniciadoras (caspase-8 e caspase-9) clivam formas inativas de caspases efetoras, ativando-as. Caspases efetoras (caspase-3 e caspase-7) por sua vez clivam outras proteínas da célula resultando no processo apoptótico. Adaptado de: Damiani (2004).

O proto-oncogene *BCL-2* foi descrito como expresso em 80% dos pacientes com linfoma folicular de células B, como consequência da translocação t(14:18) (TSUJIMOTO et al., 1984). A expressão de Bcl-2 é extremamente variável em diferentes tipos de cânceres. Enquanto a hiperexpressão de Bcl-2 está relacionada à progressão tumoral, pior prognóstico e resistência às terapias

anticâncer em alguns tumores, como cérvix, bexiga, pâncreas, ovário, próstata e linfoma (BELKA e BUDACH, 2002; LETAI, 2008; CHIPUK et al., 2010; AZMI et al., 2011; BAJWA et al., 2012), a expressão elevada desta proteína associa-se com um melhor prognóstico em outros tumores, como câncer de mama, pulmão e gástrico (ISHIDA et al., 1997; BELKA e BUDACH, 2002; LIU et al., 2011).

A proteína pró-apoptótica Bax tem um papel antagonista a Bcl-2. Essa proteína é responsável pela promoção da permeabilização da membrana mitocondrial, permitindo assim a liberação do citocromo c e consequente desencadeamento da apoptose (RENAULT e MANON, 2011). A ausência de Bax está relacionada à interrupção da apoptose em diversos tipos celulares (WEI et al., 2001). Essa proteína tem a capacidade de formar homodímeros (Bax-Bax) assim como heterodímeros ao se ligar com Bcl-2 (Bax-Bcl-2) (OLTVAI et al., 1993). Essa interação é fundamental para sobrevivência celular, já que estudos indicam que o homodímero Bax-Bax induz a apoptose, enquanto o heterodímero Bax-Bcl-2 a suprime (YIN et al., 1994). Além disso, a hiperexpressão de Bax está associada à sensibilidade para alguns quimioterápicos (MCPAKE et al., 1998).

Em SPM, o real papel e o significado clínico desses marcadores relacionados à apoptose ainda é controverso. Sabah et al. (2007) encontraram altas taxas de expressão de Bcl-2 e Bax (38.8% e 92.8%, respectivamente) em SPM e demonstraram uma correlação entre a expressão de Bcl-2 e o grau histológico e, conseqüentemente, com um pior prognóstico para esses pacientes. De forma semelhante, Nakanishi et al. (1997) demonstraram uma relação entre a expressão de Bcl-2, detectada em 43% dos casos, e o tamanho do tumor, indicando o uso dessa proteína para predizer o prognóstico dos pacientes com SPM. Já Lahat et al. (2010), apesar da imunodeteção de altos níveis de Bcl-2

(53%), não encontraram associação entre a expressão de Bcl-2 e a sobrevida dos pacientes. Do mesmo modo, no estudo realizado por Dan'ura et al. (2002) não foi observada correlação significativa entre a expressão de Bcl-2 e Bax (expressos em 32,1% e 40,8% dos casos, respectivamente) e o prognóstico tumoral. Entretanto, outros estudos destacam a relevância prognóstica desses marcadores em SPM. Sun et al. (2006) revelaram uma relação entre a atividade apoptótica tumoral, associada com a expressão de Bax e Bcl-2, e um pior prognóstico em sarcomas sinoviais. Köhler et al. (2002), quantificando mRNA, mostraram que a hiperexpressão combinada de ambos Bax/Bcl-2 promove um aumento de 6,5 vezes no risco relativo de morte relacionada ao tumor em pacientes com SPM.

1.5 Microarranjos de Tecidos (TMA)

O termo “fator prognóstico” refere-se a uma série de aspectos clínicos, histopatológicos ou moleculares capazes de prever a evolução de um tumor, independente de tratamento (CORDON-CARDO, 1997). Estudos prognósticos em câncer requerem a análise de um número considerável de pacientes ou espécimes tumorais, a fim de validar um marcador como fator prognóstico. A análise molecular de um grande número de amostras é um procedimento dispendioso, tanto do ponto de vista financeiro como operacional. A fim de analisar um maior número de marcadores ou de espécimes tumorais, com economia e precisão, métodos baseados em microarranjos de tecidos (TMA: do inglês *tissue microarray*) foram desenvolvidos, possibilitando a análise de um marcador molecular, pela técnica de imuno-histoquímica, em um grande número de amostras (FU e JEFFEY, 2007; MARCHIO e REIS-FILHO, 2008; CHEANG et al., 2008).

O TMA é considerado uma etapa importante para a consolidação do conhecimento gerado através dos estudos de genomas e transcriptomas, realizados com a técnica de “cDNA Microarrays”. Esta técnica determina quais são os genes hiperexpressos ou hipoexpressos em um tumor e que poderiam ser associados ao prognóstico tumoral, incluindo o crescimento das células tumorais, o potencial de recorrência local ou de metástase regionais e à distância, a sobrevida do paciente ou ainda, a resistência à quimioterapia e radioterapia (SAUTER e MIRLACHER, 2002).

A técnica de microarranjo de tecido (TMA) é uma metodologia simples que tem revolucionado as pesquisas em biologia molecular e patologia. Consiste na montagem de um agrupamento de amostras teciduais em um único bloco de parafina, para posterior análise da expressão de proteínas teciduais, por meio da técnica de imuno-histoquímica (KONONEN et al., 1998).

As principais vantagens da técnica consistem na rapidez da análise molecular e na preservação dos tecidos, uma vez que somente pequenos filetes cilíndricos são removidos do bloco doador, na pesquisa em larga escala de fatores prognósticos ou preditivos das neoplasias, e ainda na validação fenotípica (protéica) da hiperexpressão ou hipoexpressão gênica identificada nos estudos feitos pela análise da quantificação do DNA complementar. O método permite a avaliação de um grande número de marcadores moleculares a partir de vários cortes consecutivos, possibilitando economia de reagentes e de tempo na avaliação uniforme de vários tumores representados em diferentes estágios, graus e subtipos histológicos. A possibilidade de realização de estudos retrospectivos em tecidos arquivados é também uma importante vantagem do método, que usualmente não é aplicada às outras pesquisas genômicas ou

transcriptômicas que exigem material biológico colhido a fresco ou congelado (ZHANG et al., 2003; ANDRADE et al., 2007).

Os estudos de TMAs utilizam material biológico fixado em formalina e incluído em blocos de parafina. A princípio, são confeccionadas lâminas contendo tecido com suficiente representatividade tumoral, coradas com hematoxilina-eosina, a fim de direcionar as áreas teciduais a serem removidas por uma agulha grossa (*core biopsy*). As áreas removidas são marcadas nos blocos de parafina selecionados, denominados blocos doadores. Os cilindros de tecido apresentam diâmetros que podem variar de 0,6 mm a 2,0 mm. Os cilindros retirados dos blocos doadores são introduzidos em um novo bloco denominado receptor, por meio de aparelhos manuais ou semi-automatizados, seguindo uma sequência previamente estabelecida em uma planilha. A planilha descreve com precisão a identidade de cada cilindro de tecido e sua posição no bloco receptor. O bloco receptor final pode conter até mil amostras de tumores dependendo do diâmetro do cilindro utilizado. A partir dos blocos receptores, montados com os arranjos dos pequenos cilindros de tecidos, são preparados os cortes histológicos, que devem ser realizados de uma só vez em lâminas sequenciais numeradas, sem descarte dos níveis intermediários para melhor aproveitamento do bloco receptor. Para a montagem, lâminas contendo adesivos especiais são utilizadas. Os cortes são colhidos em fita adesiva e aplicados nessas lâminas. Por último, a fita adesiva é retirada pela exposição à luz ultravioleta (VODUC et al., 2008) (Figura 3).

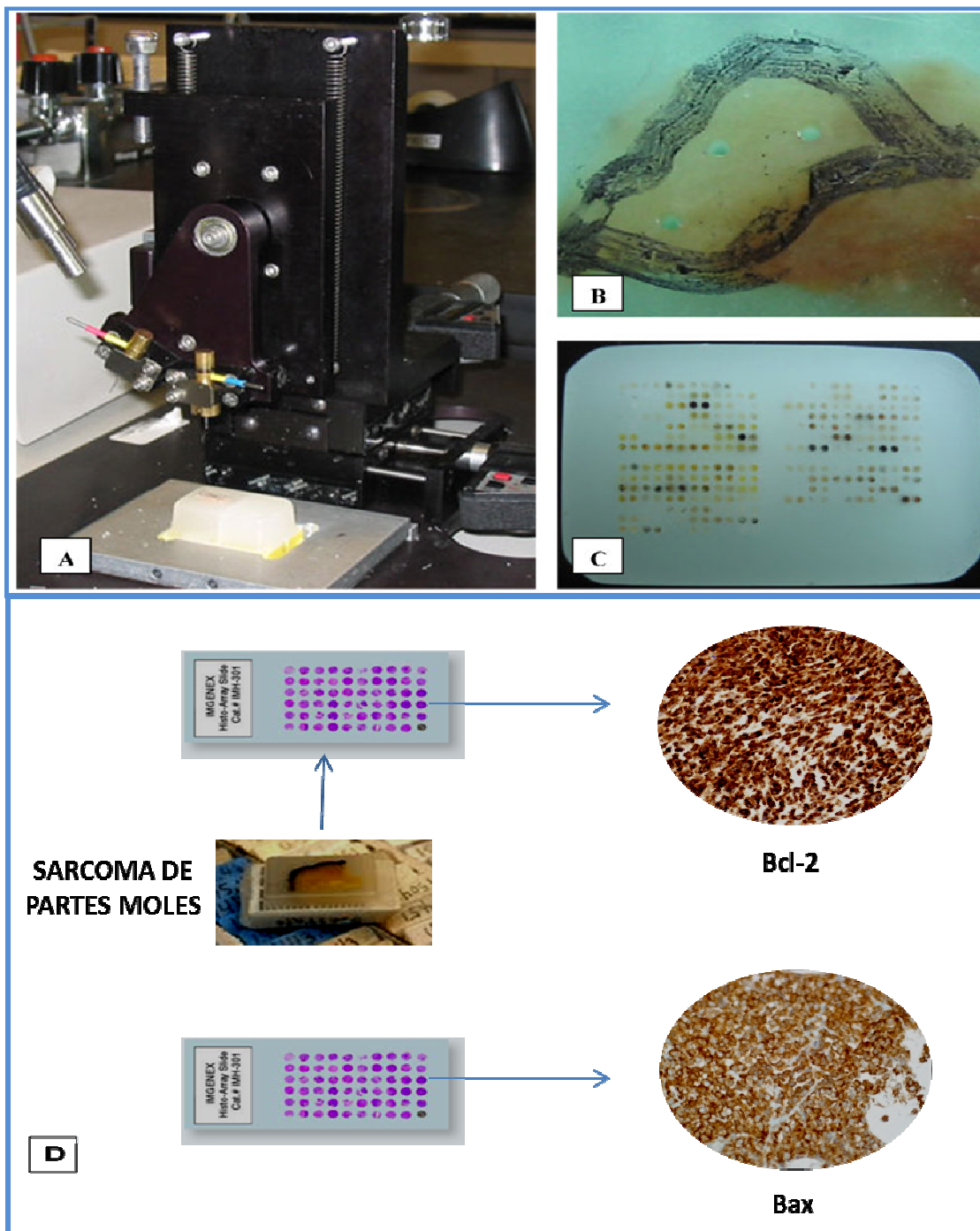


Figura 3. Construção do microarranjo de tecido (TMA). (A) – Equipamento usado na construção dos TMAs. Os principais componentes do equipamento são duas agulhas de grande calibre com estiletes, um dispositivo de fixação do bloco de parafina e micrometros de posicionamento dos blocos e agulhas. (B) “Bloco Doador” de onde são retirados os cilindros de tecido a partir da área selecionada e marcada pelo patologista. (C) “Bloco Receptor” completo contendo os cilindros de tecido já posicionados. O bloco apresentado contém cerca de 300 cilindros de tecidos. (D) Secção do bloco doador, confecção das lâminas e leitura (Adaptado de: Voduc et al., 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Os SPM de extremidades compreendem um grupo raro de doenças de difícil diagnóstico com baixas taxas de sobrevida e limitadas propostas terapêuticas.

Estudos imuno-histoquímicos envolvendo os marcadores apoptóticos Bcl-2 e Bax em SPM ainda são raros e não respondem explicitamente o papel prognóstico desses marcadores nos SPM do adulto.

A elucidação do papel prognóstico de Bcl-2 e Bax em SPM de extremidades poderá contribuir para o estabelecimento de protocolos terapêuticos mais específicos e eficazes, além de estimular o uso rotineiro desses marcadores para os casos de SPM.

Com base na literatura revisada, nenhum estudo realizou a análise simultânea da expressão imuno-histoquímica de Bcl-2 e Bax em SPM de extremidades.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a importância clínica dos marcadores apoptóticos Bcl-2 e Bax em sarcomas de partes moles de extremidades, utilizando a técnica de microarranjos de tecidos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a expressão citoplasmática de Bcl-2 e Bax, por meio de imunohistoquímica em microarranjos de tecidos, em espécimes de SPM de extremidades.

Descrever os aspectos clínico-patológicos dos pacientes com SPM de extremidades, incluindo tamanho do tumor, metástases linfonodais e à distância, grau tumoral, idade, gênero, estadió clínico-patológico, tipos histológicos e as possíveis relações com a sobrevida.

Investigar as possíveis associações entre a imunodeteção citoplasmática de Bcl-2 e Bax e os aspectos clínico-patológicos dos pacientes com SPM de extremidades.

Investigar as possíveis associações entre a expressão de Bcl-2 e Bax e a sobrevida dos pacientes com SPM de extremidades.

Contribuir para melhor elucidação do papel dos marcadores relacionados a apoptose no prognóstico dos pacientes com SPM de extremidades.

4 PUBLICAÇÃO

4.1 Artigo a ser submetido à *Human Pathology*

Overexpression of Bcl-2 and Bax as potential prognostic markers in soft tissue sarcomas of extremities

Diego Franciel Marques Mühlbeier MS¹, Vera Aparecida Saddi PhD^{1,2}, Élbio Cândido de Paula MD², Isabela Werneck Cunha MD, PhD³, José Humberto T. G. Fregnani MD, PhD⁴, Wilmar José Manoel MD, PhD^{5,*}

¹Master's Program in Genetics, Pontifical Catholic University of Goiás, Goiânia, Brazil.

²Pathology Department, Araújo Jorge Hospital, Association Against Cancer in Goiás, Goiânia, Brazil.

³Department of Pathological Anatomy, A.C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil.

⁴Hospital of Cancer of Barretos, Fundation Pio XVII, Barretos, Brazil.

⁵Medical School, Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil.

*Corresponding author

Rua S-6, 664 – Ed. Araras – apt. 201, St. Bela Vista

74823-470 – Goiânia, GO, Brazil

Phone: 55 62 3255 1482

Fax: 55 62 3265 0400

E-mail: wilmarmanoel@brturbo.com.br

Summary

Bcl-2 and Bax proteins are key regulators of programmed cell death or apoptosis, a process that is deregulated in many human diseases, particularly cancer. Overexpression of anti-apoptotic Bcl-2 protein is associated with drug resistance and poor clinical outcome in cancer patients. The expression of pro-apoptotic Bax protein, commonly detected in soft tissue sarcoma (STS), is often associated with chemiosensitivity in different tumors. Studies on the clinical implications of apoptosis-related markers Bcl-2 and Bax in STS are limited. In this study, immunohistochemistry for Bcl-2 and Bax was performed on tissue microarrays of 86 cases of adult soft tissue sarcomas of the extremities. Bcl-2 and Bax positive expression was detected in 25.9% and 66.7% of the sarcomas, respectively. Overexpression of both, Bcl-2 and Bax, was directly associated with histological grade and clinical stage. A significant association between Bax and Bcl-2 expression was also observed ($p = 0.007$). The 5-year overall survival for the group was 57%, and it was lower for cases that overexpressed Bcl-2 (47.6% vs 58.3%) and Bax (50% vs 66.7%), although not statistically significant. After multivariate analysis, only the high histological grade appeared as an independent prognostic factor for the patients ($p = 0.043$, HR = 8.0, 95% CI, 1.1-60.1). In our study, Bcl-2 and Bax expression was significantly associated with histological grade and clinical stage, which are classical factors of poor prognosis. We suggest the use of these proteins as potential prognostic markers in STS of extremities.

Keywords: Soft tissue sarcomas; Apoptosis; Bcl-2; Bax; Tissue Microarray.

1. Introduction

Soft tissue sarcomas (STS) are a group of rare, highly heterogeneous neoplasms that can arise anywhere in the body, being more frequent in the extremities (59%), followed by the trunk (19%), retroperitoneum (15%) and head and neck (9%) [1]. The relatively low incidence, high histopathological diversity, multiplicity of anatomical sites and unpredicted biological behavior make diagnose and treatment for such tumors a real challenge. The overall survival rate at five years is about 60% [1], with a high rate of variability according to grade, size, vascular invasion, necrosis, and peripheral tumor growth pattern, which are important prognostic factors [2].

Programmed cell death (apoptosis) is controlled by Bcl-2 proteins family, including anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins, such as Bcl-2 and Bax, respectively. These are mitochondrial proteins that act by inhibiting activation of apoptosis (Bcl-2), or by changing mitochondrial membrane integrity leading to cytochrome c release, and triggering apoptosis (Bax) [3]. Slight changes in these proteins dynamic balance may result either in inhibition or activation of cell death [4].

Bcl-2 protein plays an important role in tissue homeostasis and it is scarcely expressed in most tissues. However, the degree of expression can vary depending on the type and cellular location [5]. Bcl-2 expression is commonly detected in human cancers, and their overexpression has been associated with tumor initiation, progression, and resistance to current anticancer therapies, resulting in a worse prognosis for cancer patients [6].

Bax protein is related to the apoptosis in many cell types and its absence is associated to the interruption of apoptosis [7]. Bax monomers have the ability to

combine forming homodimers (Bax/Bax) as well as heterodimers by binding to Bcl-2 (Bax/Bcl-2). Such interactions are vital for cell survival after an apoptotic stimulus [8]. It has been reported that the Bax/Bcl-2 heterodimers suppress apoptosis, while the homodimer Bax/Bax induces cell death [9]. Deregulation of apoptosis promoted by changes in p53 or Bax gene expression is associated with a worse prognosis in several cancers [10, 11]. Furthermore, the expression of Bax is associated with chemosensitivity to some therapeutic agents [12], which contributes to a better therapeutic response.

Despite the importance in controlling tumor growth, apoptosis-related markers Bcl-2 and Bax are not routinely assessed in the practice of most pathology laboratories worldwide. This is due mainly to conflicting results on prognostic and predictive value of these markers in oncology. In STS, some studies highlighted the prognostic role of Bcl-2 gene family members [13-18], however, such studies are still limited in order to clearly define the clinical role of apoptosis markers, especially in STS of extremities.

The objective of this study was to evaluate the expression of Bcl-2 and Bax apoptotic markers in patients with STS of extremities and to investigate the possible associations of these markers with the clinicopathological factors and survival.

2. Patients and Methods

2.1 Samples

A group of 86 cases of Soft Tissues Sarcomas of extremities, treated from 1996 to 2006, were selected from the files of the Pathology Department of Hospital Araújo Jorge Goiânia-GO, Brazil. Paraffin blocks from each patient were

recovered from the files and one pathologist (ECP) from Hospital Araújo Jorge reviewed the slides, confirming the diagnosis. Sections, prepared from each block, were stained with hematoxylin-eosin and analyzed by immunohistochemistry with a panel of different antibodies in order to define the precise histological classification of the tumors. Two pathologists (IWC and FS) from Hospital A. C. Camargo, São Paulo, Brazil, were involved in the analysis. The tumors were classified and graded according to the World Health Organization classification of the soft tissue sarcomas. Only cases with complete agreement between the two pathologists were included in the study. For tissue microarray (TMA), selected sarcomas samples were prepared. The following histological types were included: 29 synovial sarcomas, 19 myxofibrosarcomas, 11 leiomyosarcomas, 9 pleomorphic sarcomas, 7 liposarcomas, 5 dermatofibrosarcoma protuberans, two malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST), one clear cell sarcoma, two spindle cell sarcomas not otherwise specified and one solitary fibrous tumor. The stage was based according to the American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification [19]. This study was approved by Institutional Ethical Committee of Araújo Jorge Hospital.

2.2. TMA construction

From the previous defined areas, core biopsies were taken using a tissue microarray (Beecher Instruments[®], Silver Springs, USA). Tissue cores with a dimension of 1.0 mm from each specimen were punched and arrayed in duplicate on a recipient paraffin block. Each core was spaced 0.2 mm apart. After cutting on the recipient block and transferring with an adhesive tape to coated slides for subsequent UV cross-linkage (Instrumedics Inc[®], Hackensack, NJ), the slides were dipped in a layer of paraffin to prevent oxidation, and kept in a -20°C freezer.

Five cases were excluded for the Bcl-2 and Bax analyses, due to the scarce material. This limitation resulted in an alternative distribution of the cases at table 2.

2.3. Immunohistochemistry of TMA

Immunohistochemistry analysis for Bcl-2 and Bax was carried out for 81 samples in two slides of different TMA levels, representing 4-fold redundancy for each case. The second slides were 25 sections deeper than the first, resulting in at least 250 μm of distance between the two sections, and assuring complete different cell samples for each tumor. This approach is very useful to improve concordance between immunohistochemistry results performed on sections from TMA and on standard full tissue sections.

TMA slides were deparaffinized in xylene (20 minutes incubation at 60°C and 20 minutes at room temperature), and then rehydrated in a series of alcohol (100%, 95%, 80% and 70%, respectively) and water rinses. Heat-induced antigen retrieval was performed using a domestic pressure cooker (Eterna, Nigro®) with a boiled 0.01 M sodium citrate buffered solution (pH 6.0) for 4 min and cooled under running water, as described previously [20].

Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the sections in a methanol bath, containing 3% hydrogen peroxide for 20 min, followed by washing in distilled water. After that, the primary antibody (Table 1) was diluted in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, with 0.1% sodium azide (Sigma, catalog S8032, USA) and 1% bovine serum albumin (Sigma, catalog A9647, USA) to reduce background staining and incubated for 30 min at 37°C and overnight at 4°C in a moist chamber. Preliminary testing was performed in our laboratory to identify the best concentration for each antibody and to choose the negative and positive

controls using the dilution data supplied by the manufacturer as the starting point. The staining procedure was performed using the labeled streptavidin biotin method (DakoCytomation, catalog K0690, USA). After washing the primary antibody with PBS, the slides were incubated for 30 min at 37°C with the Link, washed with PBS and incubated for another 30 min at 37°C with streptavidin. The slides were developed with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, catalog D5637, USA), 1% dimethyl sulfoxide (Sigma, catalog D5879, USA) and 0.06% hydrogen peroxide in PBS for 5 min. Then, the slides were counterstained with Harris's hematoxylin, dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and mounted with Entellanneu (Merck, catalog 1.07961, Germany). All the reactions were processed in the same environmental conditions.

2.4. Immunohistochemistry evaluation

TMA evaluation was performed independently by two pathologists. Both Bcl-2 and Bax cytoplasmic staining were considered. The results were considered negative when there were no labelled cytoplasm; weakly positive when labelled cytoplasm corresponded up to 25% of the cells; moderate positive when labelled cytoplasm corresponded to 25% up to 75% of the cells; and strongly positive when more than 75% of the cytoplasm were labelled. For the statistical analysis, Bcl-2 and Bax scores were classified in a high expression group (strong and moderate immunoreactivity) and a low expression group (weakly and negatively immunoreactive). Two spots were assessed for each case in a separate reaction (duplicate) and analyzed by two observers. The end results were the average of the four reviews.

2.5. Statistical analyses

Fisher exact test and chi-square test were used to examine the possible associations between the expression of Bcl-2 and Bax with clinicopathological characteristics. Kaplan-Meier survival analysis was used to generate survival curves. The log rank test was utilized to examine the difference of the accumulated survival function. Significant factors by log-rank test were then analyzed for independent prognostic importance by the Cox proportional hazards regression. All statistical analyses were performed using the SPSS statistical software package (version 15.0, SPSS Inc., USA). Two-sided p values were calculated and $p < 0.05$ was considered to be significant.

3. Results

3.1. Characteristics of selected patients and tumors

A total of 86 adult patients older than 18 years of age (mean = 45.7, range 18-91), diagnosed with soft tissue sarcoma of the extremities was admitted for the study. High grade (grade 2 or 3) tumors affected 71 patients (82.6%), while 14 (16.3%) were classified as low grade (grade 1) sarcomas and for one patient (1.2%) data related to the histological grade was not recorded. Most patients were male (52.3%; $n = 45$) and older than 40 years of age (57%; $n = 49$). The most frequent sites were lower limbs (76.7%; $n = 66$). The most common histological type was the synovial sarcoma (33.7%; $n = 29$), followed by myxofibrosarcoma (22.1%; $n = 19$); leiomyosarcoma (12.8%; $n = 11$); and liposarcoma (8.1%; $n = 7$). The median tumor size was 10 cm, ranging from 2 cm to 48 cm, of which 70 (81.4%) presented tumors with more than 5 cm. Distant metastases were present at the diagnosis for 12 patients (14%) and five patients (5.8%) were diagnosed

with lymph node metastasis. The patients were classified according to clinicopathological stages: 14 (16.3%) were in stage I; eight (9.3%) in stage II; 50 (58.1%) in stage III; and 12 (14%) were in stage IV.

3.2. Bcl-2 and Bax expression and association with clinicopathological parameters

Positive immunostaining for Bcl-2 and Bax was determined in 81 of 86 patients. Out of all tumors evaluated, 21 (25.9%) presented with Bcl-2 high expression and 54 (66.7%) with Bax high expression. The overexpression of both Bcl-2 and Bax was directly associated with synovial sarcoma, histological grade and clinical stage; and inversely associated with mixofibrossarcomas. In addition, there was an inverse association between the expression of Bcl-2 and age of patients, and between Bax and liposarcoma. Other clinicopathological factors such as gender, location, tumor size, lymph node and distant metastasis did not show any significant association with Bcl-2 or Bax proteins (Table 2).

A significant association between cytoplasmic expression of both the Bcl-2 and Bax proteins was demonstrated in this study (Table 3; $p = 0.007$). Furthermore, the concurrent overexpression of both Bcl-2/Bax was associated with histological grade ($p = 0.036$) and clinical stage ($p = 0.031$).

3.3. Survival analysis

The 5-year overall survival (OS) for the patients group was 57% (Figure 1). Univariate analysis of the data showed that histological grade (Figure 2; $p = 0.005$) and stage (Figure 3; $p = 0.002$) were significantly associated with decreased survival. High grade patients showed poorer survival compared to the low grade

group in the univariate (Figure 2; $p = 0.005$) and multivariate analysis ($p = 0.043$, HR = 8.0, 95% CI, 1.1-60.1).

The 5-year OS of patients was 58.3% for low and 47.6% for high Bcl-2 expression group; and 66.7% for low and 50% for high Bax expression, respectively. Kaplan-Meier curves of OS stratified by Bcl-2 and Bax status are shown in Figures 4 and 5, respectively. The overall survival didn't show any significant difference ($p > 0.05$, log rank test) for the two groups.

In this study, by comparing the survival curves obtained for concurrent Bcl-2/Bax high expression and the other combinations, no significant difference was observed (47.4% vs 58.1%, respectively; $p > 0.05$, log rank test).

4. Discussion

In this study, a tissue microarray with 86 STS of extremities was employed in order to analyze the expression of apoptotic Bcl-2 and Bax proteins, using immunohistochemistry. Tissue microarray allows the analysis of a tumor series, comprising different histological types and grades, with the advantage of using a uniform method for all tumor samples, avoiding methodological variation.

Apoptotic signaling can initiate from outside the cell via plasma membrane receptors (extrinsic pathway), or through stress that originates from within the cell (intrinsic or mitochondrial pathway) [21].

The intrinsic pathway is primarily regulated by the Bcl-2 family and triggered by intracellular stress signals such as DNA damage, oncogenes expression, hypoxia, and growth factor withdrawal [21]. This pathway is initiated by mitochondrial outer membrane permeabilization, which allows soluble proteins (e.g., cytochrome c) in the mitochondrial intermembrane space to diffuse into the

cytosol. Cytochrome c released by an apoptotic stimulus binds to apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1), which promotes the activation of initiator caspase-9, in a multimolecular complex termed the apoptosome. Caspase-9 then activates executioner caspases-3 and -7, which cleave cellular substrates to promote the apoptotic phenotype [22].

Although the Bcl-2 proteins are implicated in a wide range of diseases, cancer is the best characterized one. The Bcl-2 proto-oncogene was first described in non-Hodgkin's lymphoma, as a result of its involvement in the t(14;18) chromosomal translocation [23].

Many studies have reported that the overexpression of Bcl-2 contributes to cancer progression, poor prognosis and resistance to apoptosis induced by standard anticancer therapies [24, 25].

The pro-apoptotic protein Bax (Bcl-2 Associated protein X) plays a pivotal role in the mitochondria-dependent apoptotic pathway. In contrast to Bcl-2, Bax promotes permeabilization of the mitochondrial membrane and consequent release of cytochrome after an apoptotic stimulus[26].

The expression of apoptosis-related markers Bcl-2 and Bax has been extensively evaluated in several tumors, in which the rates of expression and association with predictive and prognostic factors are highly variable. Expression of Bcl-2 is very heterogeneous in several tumour types. For example, increased Bcl-2 levels are generally predictive of aggressive disease, poor prognosis, and chemotherapeutic resistance in human epithelial cancers such as cervix, bladder, pancreatic, ovarian, prostate and lymphoma [21, 24, 25, 27]. However, the overexpression of Bcl-2 was associated with better prognosis in breast cancer, non-small-cell lung cancer and gastric cancer [27-29]. Already abnormal

expression of Bax has been indicated as a prognostic indicator for patients with ovarian cancer and bladder cancer [11, 30].

In STS, the exact role and clinical significance of Bcl-2 and Bax remain to be elucidated. In our study, high Bcl-2 expression was detected in 25.9% of soft tissue sarcoma of extremities cases. Dan'ura et al [17] , Sabah et al [15], Nakanishi et al [14] and Lahat et al [16] reported higher rates of Bcl-2 immunoreactivity in soft tissue sarcomas (32.1%, 38.8%, 43% and 53%, respectively). High Bax expression was detected in 66.7% of the cases in our study. Bax expression is a common finding in soft tissue sarcomas and was detected in 92.8% of soft tissue sarcomas in the study of Sabah et al [15]. Dan'ura et al [17] and Kawauchi et al [31] reported lower rates of Bax expression in soft tissue sarcomas (40.8% and 51%, respectively). Different cut-offs used in immunohistochemical analysis may explain these differences, since we used in our study a cut-off higher than Sabah et al [15] and Lahat et al [16] (25% vs 10%), and lower than Kawauchi et al [31] (25% vs 50%). The heterogeneity of technical issues (methods of detection, different reagents among assays, different positive/negative cut-off levels, different specimen preparations, etc.) is an important source of variability in STS studies [32].

By comparing histological types, the higher Bcl-2 expression was found in synovial sarcoma (73.1%; $p < 0.001$) and rarely detected in other histological types. Bax expression was more frequent in leiomyosarcoma (90.9%; $p = 0.089$), followed by synovial sarcoma (84.6%; $p = 0.023$), myxofibrosarcoma (47.7%; $p = 0.041$), dermatofibrosarcoma (40%; $p = 0.327$) and liposarcoma (16.7%; $p = 0.014$). The disproportion observed in Bcl-2 and Bax cytoplasmic expression among different histological types of sarcomas, in our series, can be explained by

the diverse histological origin of such tumors. Bcl-2 and Bax expression is highly variable according to the tumor type [15, 18, 31], being frequent in synovial sarcoma [18, 31], and rarely observed in others, such as fibrosarcoma and malignant fibrous histiocytoma [15].

A relationship between Bcl-2 and Bax expression was found in our study ($p = 0.007$). Köhler et al [13] showed that the combinations of high Bax/Bcl-2 mRNA expression provide an increase of 6.5 fold in the relative risk of tumor-related death in patients with STS. In our study, overexpression of both Bcl-2 and Bax, analyzed separately or combined, was associated with the histological grade and clinical stage. High grade tumors showed higher expression of Bcl-2 and Bax than low grade tumors (30.9% vs 0%, $p = 0.03$; 75% vs 17.7%, $p < 0.001$; respectively). Likewise, Bcl-2 and Bax immunodetection was more frequent in tumors with advanced clinical stages than in those with an early clinical stage (33.9% vs 5%, $p = 0.017$; 74.6% vs 40%, $p = 0.005$; respectively). Among the clinicopathological factors analyzed, histologic type and stage were related to survival by univariate analysis. Patients presenting tumors with high histological grade showed poorer survival compared to low grade tumors (50.7% vs 92.9%) in both the univariate ($p = 0.005$) and multivariate analysis ($p = 0.043$, HR = 8.0, 95% CI, 1.1-60.1). Similar results were observed by Lahat et al [16].

The statistic association between the expression of Bcl-2 and Bax with the classical factors of poor prognosis (histological grade and clinical stage), described here, supports the clinical importance of these apoptotic markers in predicting the prognosis of patients with STS of extremities. These findings are consistent with the observations reported by Sabah et al [15], which revealed significant correlation between Bcl-2 expression and histologic grade, and

therefore with poor prognosis. Similarly, Nakanishi et al [14] showed that Bcl-2 expression was correlated with a larger tumor size and it was a useful marker for predicting prognosis in STS. Sun et al [18] revealed a relationship between tumor apoptotic activity associated with Bcl-2 and Bax expression and poor prognosis in synovial sarcoma. In contrast, Dan'ura et al [17] found no correlation between Bcl-2/Bax expression and tumor prognosis.

The most effective and prevalent mechanism of apoptosis deregulation in cancer is the overexpression of anti-apoptotic proteins, such as Bcl-2 [33]. The role of both anti-apoptotic and pro-apoptotic family members in the regulation of apoptosis has become clearer in recent years. A balance between pro and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins controls the decision-making process at the mitochondrion, modulating cell sensitivity to death. Several inhibitory molecules have been used as anticancer therapy interfering in the interactions between proteins of the Bcl-2 family [25]. However, changes in other cellular pathways, such as p53 mutations, may also contribute to the regulation of programmed cell death in tumor cells. It was concluded that alterations in the p53 pathway and in genes that regulate apoptosis are common events in soft tissue sarcomas [15]. Furthermore, it is known that wild-type p53 can transcriptionally repress Bcl-2 expression while inducing expression of Bax [34]. Thus, Bax induction alone without expression of wild-type p53 might be insufficient to induce apoptosis. Data generated from studies *in vitro* suggested that expression of three proteins: Myc, Bax and p53, are required for maximal cell death to occur [35].

In summary, our data emphasize the role of changes in apoptosis-related markers in the pathogenesis of soft tissue sarcomas of extremities. Overexpression of both Bcl-2 and Bax was associated with histological grade and

clinical stage of the tumors, suggesting the use of such proteins as potential prognostic markers in STS of extremities.

References

- [1] Cormier JN, Pollock RE. Soft tissue sarcomas. *CA Cancer J Clin* 2004;54:94-109.
- [2] Carneiro A, Bendahl PO, Engellau J, et al. A prognostic model for soft tissue sarcoma of the extremities and trunk wall based on size, vascular invasion, necrosis, and growth pattern. *Cancer* 2011;117:1279-87.
- [3] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
- [4] Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2011;351:41-58.
- [5] Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:47-59.
- [6] Bajwa N, Liao C, Nikolovska-Coleska Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2012;22:37-55.
- [7] Wei MC, Zong WX, Cheng EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001;292:727-30.
- [8] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
- [9] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 1994;369:321-3.
- [10] Hermann S, Sturm I, Mrozek A, et al. Bax expression in benign and malignant thyroid tumours: dysregulation of wild-type P53 is associated with a high Bax and P21 expression in thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 2001;92:805-11.
- [11] Schuyer M, van der Burg ME, Henzen-Logmans SC, et al. Reduced expression of BAX is associated with poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer: a multifactorial analysis of TP53, p21, BAX and BCL-2. *Br J Cancer* 2001;85:1359-67.

- [12] McPake CR, Tillman DM, Poquette CA, George EO, Houghton JA, Harris LC. Bax is an important determinant of chemosensitivity in pediatric tumor cell lines independent of Bcl-2 expression and p53 status. *Oncol Res* 1998;10:235-44.
- [13] Kohler T, Wurl P, Meye A, et al. High bad and bcl-xL gene expression and combined bad, bcl-xL, bax and bcl-2 mRNA levels: molecular predictors for survival of stage 2 soft tissue sarcoma patients. *Anticancer Res* 2002;22:1553-9.
- [14] Nakanishi H, Ohsawa M, Naka N, Uchida A, Ochi T, Aozasa K. Immunohistochemical detection of bcl-2 and p53 proteins and apoptosis in soft tissue sarcoma: their correlations with prognosis. *Oncology* 1997;54:238-44.
- [15] Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E. Immunoreactivity of p53, Mdm2, p21(WAF1/CIP1) Bcl-2, and Bax in soft tissue sarcomas: correlation with histologic grade. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007;15:64-9.
- [16] Lahat G, Tuvim D, Wei C, et al. Molecular prognosticators of complex karyotype soft tissue sarcoma outcome: a tissue microarray-based study. *Ann Oncol* 2010;21:1112-20.
- [17] Dan'ura T, Kawai A, Morimoto Y, Naito N, Yoshida A, Inoue H. Apoptosis and expression of its regulatory proteins in soft tissue sarcomas. *Cancer Lett* 2002;178:167-74.
- [18] Sun B, Sun Y, Wang J, Zhao X, Wang X, Hao X. Extent, relationship and prognostic significance of apoptosis and cell proliferation in synovial sarcoma. *Eur J Cancer Prev* 2006;15:258-65.
- [19] Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. *AJCC cancer staging manual*. New York: Springer-Verlag, 2002.
- [20] Norton AJ, Jordan S, Yeomans P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. *J Pathol* 1994;173:371-9.
- [21] Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010;37:299-310.
- [22] Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:405-13.

- [23] Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, Croce CM. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 1984;224:1403-6.
- [24] Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:121-32.
- [25] Azmi AS, Wang Z, Philip PA, Mohammad RM, Sarkar FH. Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 2011;16:59-70.
- [26] Renault TT, Manon S. Bax: Addressed to kill. *Biochimie* 2011;93:1379-91.
- [27] Belka C, Budach W. Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol* 2002;78:643-58.
- [28] Liu X, Cai H, Huang H, Long Z, Shi Y, Wang Y. The prognostic significance of apoptosis-related biological markers in Chinese gastric cancer patients. *PLoS One* 2011;6:e29670.
- [29] Ishida H, Irie K, Itoh T, Furukawa T, Tokunaga O. The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. *Cancer* 1997;80:1034-45.
- [30] Ajili F, Kaabi B, Darouiche A, et al. Prognostic value of bcl-2 and bax tumor cell expression in patients with non muscle-invasive bladder cancer receiving bacillus calmette-guerin immunotherapy. *Ultrastruct Pathol* 2012;36:31-9.
- [31] Kawauchi S, Fukuda T, Oda Y, et al. Prognostic significance of apoptosis in synovial sarcoma: correlation with clinicopathologic parameters, cell proliferative activity, and expression of apoptosis-related proteins. *Mod Pathol* 2000;13:755-65.
- [32] Ottaiano A, De Chiara A, Fazioli F, et al. Biological prognostic factors in adult soft tissue sarcomas. *Anticancer Res* 2005;25:4519-26.
- [33] Anvekar RA, Ascioffa JJ, Missert DJ, Chipuk JE. Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Front Oncol* 2011;1.
- [34] Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2001;29:684-8.

[35] Taylor AC, Schuster K, McKenzie PP, Harris LC. Differential cooperation of oncogenes with p53 and Bax to induce apoptosis in rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer* 2006;5:53.

Table 1 Characteristics of antibodies used in immunohistochemical analysis

| Antigen | Clone | Dilution | Commercial source |
|---------|-------------------|----------|-------------------|
| Bcl-2 | 124 | 1:20 | Dako |
| Bax | Rabbit Polyclonal | 1:100 | Dako A 3533 |

Table 2 Association between clinicopathological parameters and Bcl-2 and Bax expression in soft tissue sarcoma of extremities

| Variables | All cases | Bcl-2 expression | | | Bax expression | | |
|-----------------------|-----------|------------------|-----------|---------|----------------|-----------|---------|
| | | High | Low | p-value | High | Low | p-value |
| Age (years) | | | | | | | |
| < 40 | 34 | 16 (47.1) | 18 (52.9) | <0.001* | 25 (73.5) | 9 (26.5) | 0.265 |
| ≥ 40 | 47 | 5 (10.6) | 42 (89.4) | | 29 (61.7) | 18 (38.3) | |
| Gender | | | | | | | |
| Male | 43 | 10 (23.3) | 33 (76.7) | 0.560 | 27 (62.8) | 16 (37.2) | 0.431 |
| Female | 38 | 11 (28.9) | 27 (71.1) | | 27 (71.1) | 11 (28.9) | |
| Location | | | | | | | |
| Upperlimb | 20 | 6 (30) | 14 (70) | 0.632 | 11 (55) | 9 (45) | 0.202 |
| Lowerlimb | 61 | 15 (24.6) | 46 (75.4) | | 43 (70.5) | 18 (29.5) | |
| Histological grade | | | | | | | |
| Low | 12 | 0 (0) | 12 (100) | 0.03 | 2 (17.7) | 10 (83.3) | <0.001 |
| High | 68 | 21 (30.9) | 47 (69.1) | | 51 (75) | 17 (25) | |
| Tumor size (cm) | | | | | | | |
| ≤ 5 | 13 | 1 (7.7) | 12 (92.3) | 0.167 | 6 (46.2) | 7 (53.8) | 0.102 |
| > 5 | 66 | 20 (30.3) | 46 (69.7) | | 46 (69.7) | 20 (30.3) | |
| Tumor type | | | | | | | |
| Myxofibrosarcoma | | | | | | | |
| Yes | 19 | 1 (5.3) | 18 (94.7) | 0.018* | 9 (47.4) | 10 (52.6) | 0.041* |
| No | 62 | 20 (32.3) | 42 (67.7) | | 45 (72.6) | 17 (27.4) | |
| Dermatofibrosarcoma | | | | | | | |
| Yes | 5 | 0 (0) | 5 (100) | 0.32 | 2 (40) | 3 (60) | 0.327 |
| No | 76 | 21 (27.6) | 55 (72.4) | | 52 (68.4) | 24 (31.6) | |
| Synovial sarcoma | | | | | | | |
| Yes | 26 | 19 (73.1) | 7 (26.9) | <0.001 | 22 (84.6) | 4 (15.4) | 0.023 |
| No | 55 | 2 (3.6) | 53 (96.4) | | 32 (58.2) | 23 (41.8) | |
| Leiomyosarcoma | | | | | | | |
| Yes | 11 | 0 (0) | 11 (100) | 0.058 | 10 (90.9) | 1 (9.1) | 0.089 |
| No | 70 | 21 (30) | 49 (70) | | 44 (62.9) | 26 (37.1) | |
| Liposarcoma | | | | | | | |
| Yes | 6 | 0 (0) | 6 (100) | 0.331 | 1 (16.7) | 5 (83.3) | 0.014* |
| No | 75 | 21 (28) | 54 (72) | | 53 (70.7) | 22 (29.3) | |
| Lymph node metastasis | | | | | | | |
| Yes | 4 | 0 (0) | 4 (100) | 0.569 | 3 (75) | 1 (25) | 1 |
| No | 74 | 21 (28.4) | 53 (71.6) | | 49 (66.2) | 25 (33.8) | |
| Distant metastasis | | | | | | | |
| Yes | 11 | 1 (9.1) | 10 (90.9) | 0.273 | 7 (63.6) | 4 (36.4) | 1 |
| No | 70 | 20 (28.6) | 50 (71.4) | | 47 (67.1) | 23 (32.9) | |
| Stage | | | | | | | |
| I + II | 20 | 1 (5) | 19 (95) | 0.017 | 8 (40) | 12 (60) | 0.005 |
| III + IV | 59 | 20 (33.9) | 39 (66.1) | | 44 (74.6) | 15 (25.4) | |

NOTE. High Bcl-2 and Bax expression was directly associated with histological grade, clinical stage and synovial sarcoma. Data are reported as number of patients with percent in parentheses. *Inverse association.

Table 3 Association between Bcl-2 and Bax expression in soft tissue sarcoma of extremities

| Bax expression | Bcl-2 expression | | | p-value |
|-----------------------|-------------------------|-----------|----------|---------|
| | Low | High | Total | |
| Low | 25 (92.6) | 2 (7.4) | 27 (100) | 0.007 |
| High | 35 (64.8) | 19 (35.2) | 54 (100) | |
| Total | 60 (74.1) | 21 (25.9) | 81 (100) | |

NOTE. We included 81 cases on tissue microarray construction. Of these, 19/81 (23.5%) presented co-expression of Bcl-2 and Bax and 25/81 (30.9%) showed low expression for both. Data are reported as number of patients with percent in parentheses.

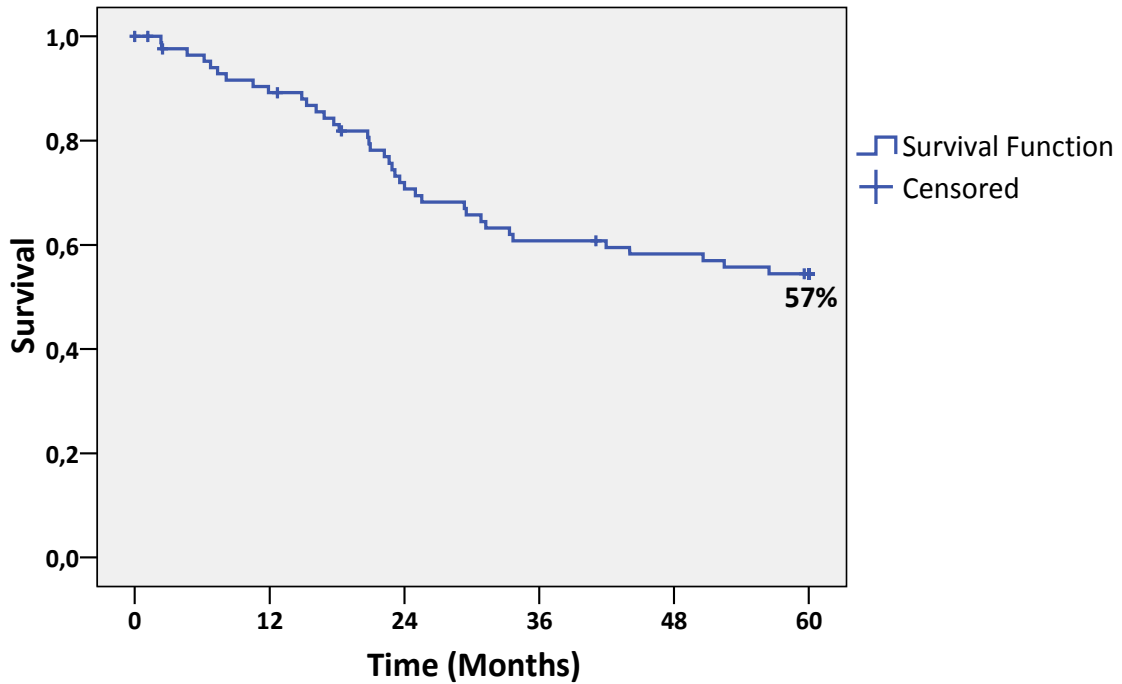


Figure 1 Kaplan-Meier overall survival curve of patients with soft tissue sarcomas of extremities.

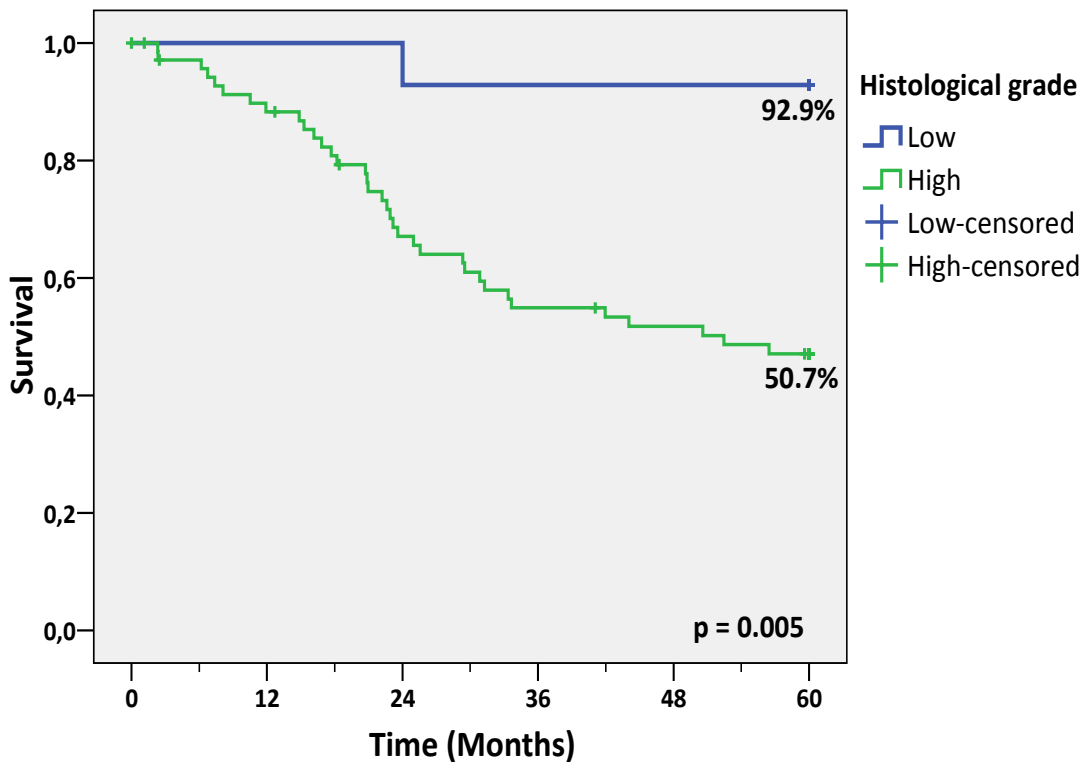


Figure 2 Kaplan-Meier analyses of overall survival according to histological grade ($p = 0.005$, log rank test). Multivariate Cox's regression hazard analysis showed that high grade patients showed an 8-fold increased risk of tumor-related death ($p = 0.043$, HR = 8.0, 95% CI, 1.1-60.1) compared with low grade patients.

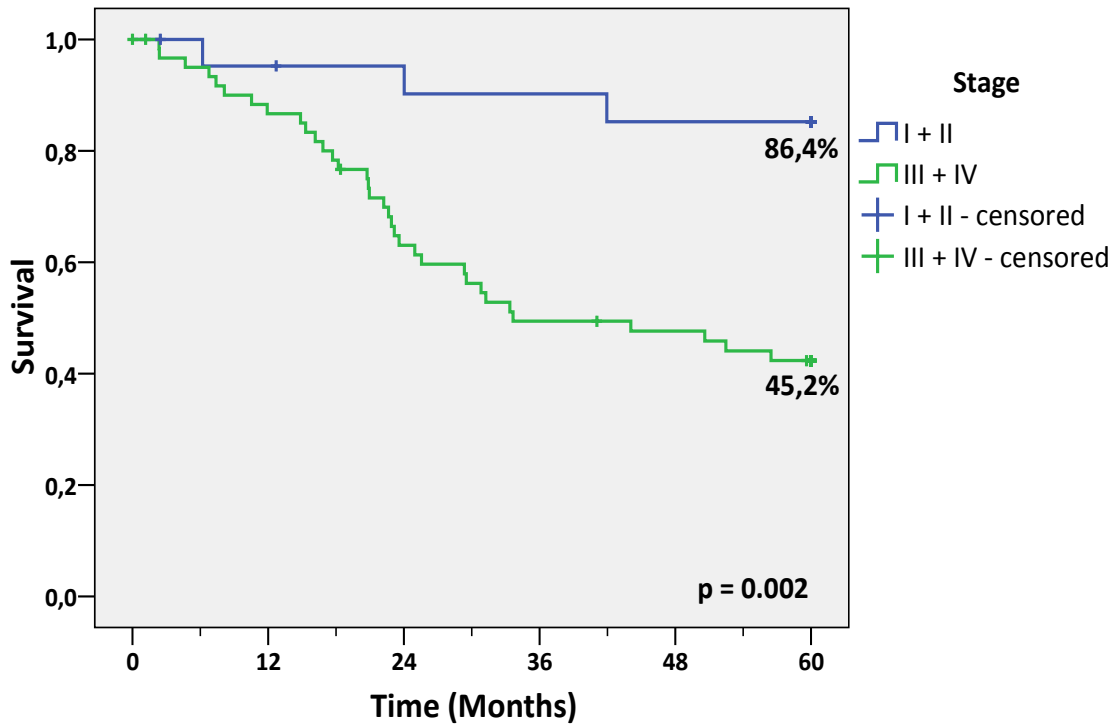


Figure 3 Kaplan-Meier analyses of overall survival according to stage ($p = 0.002$, log rank test).

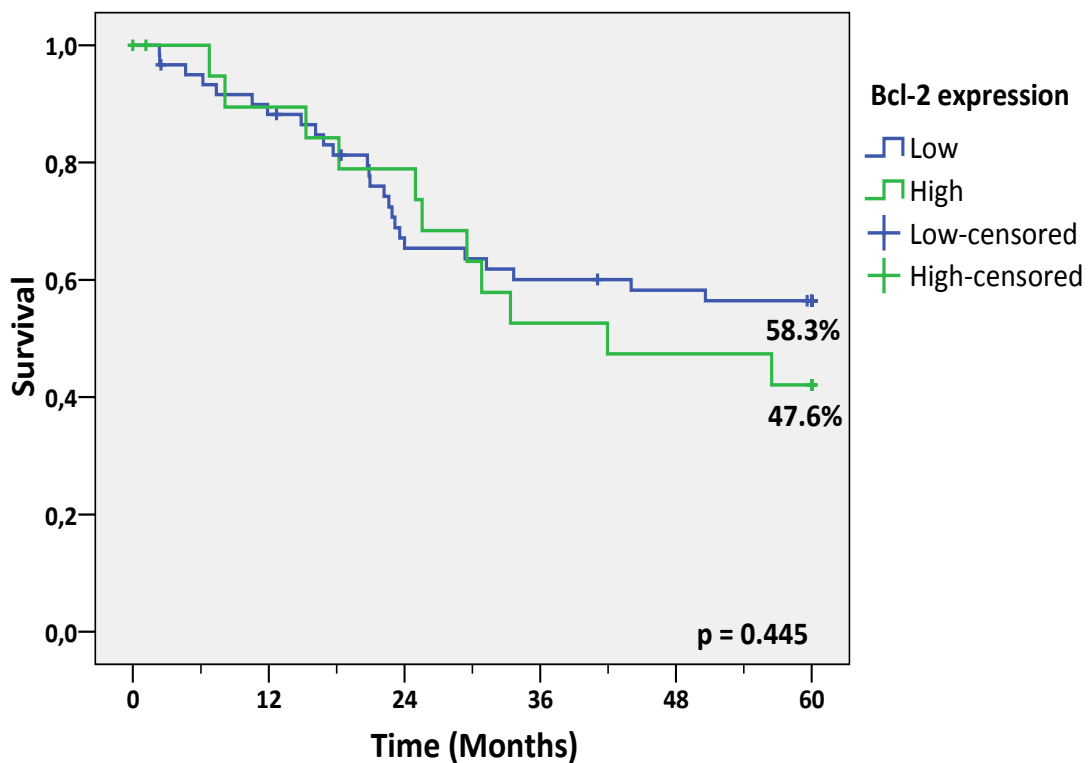


Figure 4 Kaplan-Meier analyses of overall survival according to Bcl-2 expression ($p > 0.05$, log-rank test).

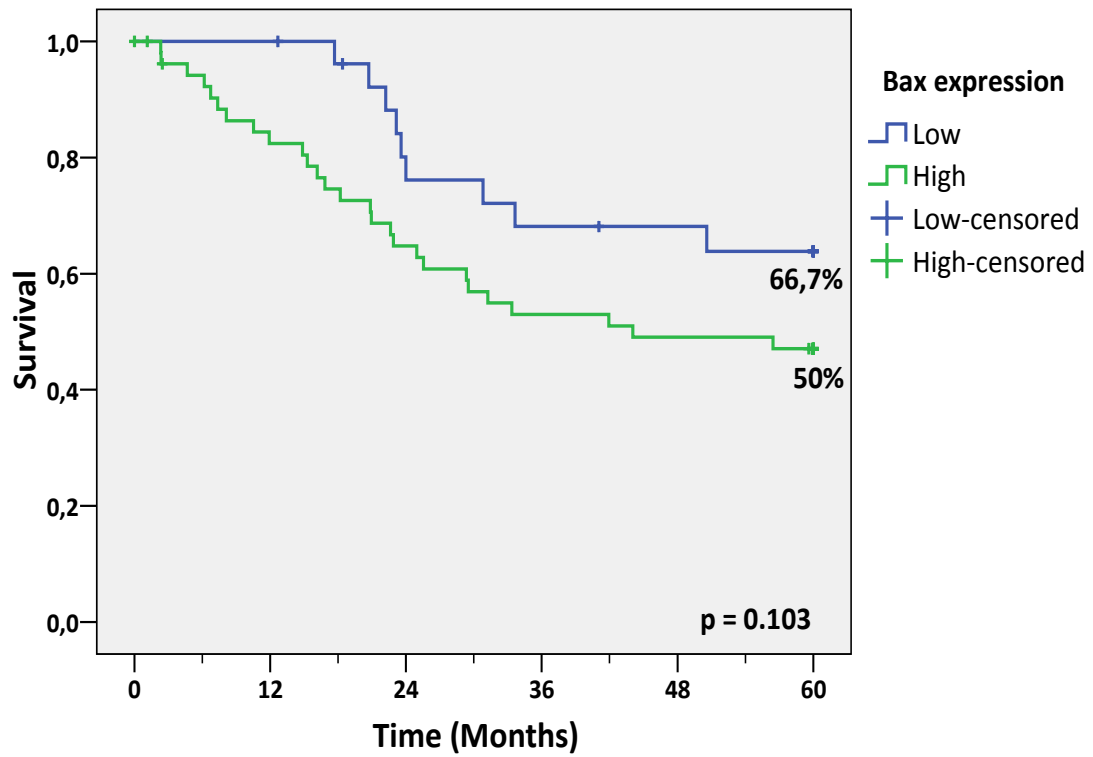


Figure 5 Kaplan-Meier analyses of overall survival according to Bax expression ($p > 0.05$, log-rank test).

5 CONCLUSÕES

Com base nos objetivos propostos neste estudo, concluímos que:

1. Nosso estudo demonstrou que a hiperexpressão citoplasmática de Bcl-2 e Bax representa um evento comum em sarcomas de partes moles de extremidades, evidenciada em 25,9% e 66,7% dos sarcomas de partes moles de extremidades analisados, respectivamente.
2. Entre as variáveis clínico-patológicas analisadas, o estadiamento clínico e o grau histológico foram os principais fatores que influenciaram negativamente a sobrevida do grupo estudado, sendo o grau histológico um fator prognóstico independente.
3. A expressão citoplasmática de ambos, Bcl-2 e Bax, foi significativamente associada aos sarcomas sinoviais, ao grau histológico e ao estadiamento clínico.
4. Pacientes cujos tumores hiperexpressavam Bcl-2 e Bax, apresentaram uma menor sobrevida em cinco anos de seguimento; entretanto, as diferenças com relação às demais combinações de níveis de expressão desses dois marcadores não foram estatisticamente significativas.
5. A avaliação imuno-histoquímica dos marcadores apoptóticos Bcl-2 e Bax, utilizando a técnica de microarranjos de tecidos, apresentou importante relevância clínica neste estudo como um possível marcador prognóstico em SPM de extremidades. Assim, recomendamos o uso de tais marcadores como ferramenta adicional para um planejamento terapêutico mais adequado nos casos de SPM de extremidades.

6 REFERÊNCIAS

AJILI F, KAABI B, DAROUICHE A, et al. Prognostic value of bcl-2 and bax tumor cell expression in patients with non muscle-invasive bladder cancer receiving bacillus calmette-guerin immunotherapy. **Ultrastruct Pathol.** 2012;36(1):31-9.

ANDRADE VP, CUNHA IW, SILVA EM, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **J Bras Patol Méd Lab.** 2007;43(1):55-60.

ANTONESCU CR. The role of genetic testing in soft tissue sarcoma. **Histopathology.** 2006;48(1):13-21.

ANVEKAR RA, ASCIOLLA JJ, MISSERT DJ, et al. Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. **Front Oncol.** 2011;1(34).

AZMI AS, WANG Z, PHILIP PA, et al. Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer. **Expert Opin Emerg Drugs.** 2011;16(1):59-70.

BAIRD K, DAVIS S, ANTONESCU CR, et al. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. **Cancer Res.** 2005;65(20):9226-35.

BAJWA N, LIAO C, NIKOLOVSKA-COLESKA Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. **Expert Opin Ther Pat.** 2012;22(1):37-55.

BELKA C and BUDACH W. Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. **Int J Radiat Biol.** 2002;78(8):643-58.

BORDEN EC, BAKER LH, BELL RS, et al. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. **Clin Cancer Res.** 2003;9:1941–56.

CARNEIRO A, BENDAHL PO, ENGELLAU J, et al. A prognostic model for soft tissue sarcoma of the extremities and trunk wall based on size, vascular invasion, necrosis, and growth pattern. **Cancer**. 2011;117(6):1279-87.

CARNEIRO A, FRANCIS P, BENDAHL PO, et al. Indistinguishable genomic profiles and shared prognostic markers in undifferentiated pleomorphic sarcoma and leiomyosarcoma: different sides of a single coin? **Lab Invest**. 2009;89(6):668-75.

CHIPUK JE, MOLDOVEANU T, LLAMBI F, et al. The BCL-2 family reunion. **Mol Cell**. 2010;37(3):299-310.

CLARK MA, FISHER C, THOMAS JM. Soft-Tissue Sarcoma. **N Engl J Med**. 2005a;353(21):2303-4.

CLARK MA, FISHER C, JUDSON I, et al. Soft-tissue sarcomas in adults. **N Engl J of Med**. 2005b;353(7):701-11.

CORDON-CARDO C. Molecular biology of sarcomas. In: De Vita VT, Hellman S, Rosemberg SA, eds. **Principles and Practice of Oncology**. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1997:1731-8.

CORMIER JN and POLLOCK RE. Soft tissue sarcomas. **CA Cancer J Clin**. 2004;54(2):94-109.

DAMIANI D. Mecanismos da Apoptose. **Manual de Patologia e Citopatologia Oncológica**, 2004.

DAN'URA T, KAWAI A, MORIMOTO Y, et al. Apoptosis and expression of its regulatory proteins in soft tissue sarcomas. **Cancer Lett**. 2002;178(2):167-74.

FLETCHER CDM, UNNI KK, MERTENS F. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. **World Health Organization classification of tumours**, vol. 5, Lyon: IARC Press, 2002.

FU J and JEFFREY SS. Transcriptomic signatures in breast cancer. **Mol. BioSyst.** 2007;3:466–472.

CHEANG MC, VODUC D, BAJDK C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res.** 2008;14(5):1368-76.

GREENE FL, PAGE DL, FLEMING ID, et al. eds. **AJCC cancer staging manual**, 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.

GUILLOU L and AURIAS A. Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. **Virchows Arch.** 2010;456(2):201-17.

HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature.** 2000;407(6805):770-6.

HERMANN S, STURM I, MROZEK A, et al. Bax expression in benign and malignant thyroid tumours: dysregulation of wild-type P53 is associated with a high Bax and P21 expression in thyroid carcinoma. **Int J Cancer.** 2001;92(6):805-11.

HESLIN MJ, LEWIS JJ, WOODRUFF JM, BRENNAN MF. Core needle biopsy for diagnosis of extremity soft tissue sarcoma. **Ann Surg Oncol.** 1997;4:425-31.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. **Estimativas 2006: Incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro, 2005.

ISHIDA H, IRIE K, ITOH T, et al. The prognostic significance of p53 and bcl-2 expression in lung adenocarcinoma and its correlation with Ki-67 growth fraction. **Cancer**. 1997;80(6):1034-45.

JEMAL A, MURRAY T, SAMUELS A, et al. Cancer statistics, 2003. **CA Cancer J Clin**. 2003;53(1):5-26.

JEMAL A, TIWARI RC, MURRAY T, et al. Cancer statistics, 2004. **CA Cancer J Clin**. 2004;54(1):8-29.

JEMAL A, SIEGEL R, XU J, WARD E. Cancer statistics, 2010. **CA Cancer J Clin**. 2010;60(5):277-300.

KAWAUCHI S, FUKUDA T, ODA Y, et al. Prognostic significance of apoptosis in synovial sarcoma: correlation with clinicopathologic parameters, cell proliferative activity, and expression of apoptosis-related proteins. **Mod Pathol**. 2000;13(7):755-65.

KÖHLER T, WURL P, MEYE A, et al. High bad and bcl-xL gene expression and combined bad, bcl-xL, bax and bcl-2 mRNA levels: molecular predictors for survival of stage 2 soft tissue sarcoma patients. **Anticancer Res**. 2002;22(3):1553-9.

KONONEN J, BUBENDORF L, KALLIONIEMI A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling tumor of specimens. **Nature Med**. 1998;4(7):844-7.

LAHAT G, TUVIN D, WEI C, et al. Molecular prognosticators of complex karyotype soft tissue sarcoma outcome: a tissue microarray-based study. **Ann Oncol**. 2010;21(5):1112-20.

LATORRE MRDO, FRANCO EL. Epidemiologia dos sarcomas. In: Lopes A (ed).

Sarcomas de partes moles. Rio de Janeiro: Medsi, 1999, p. 3-18.

LETAI AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis.

Nat Rev Cancer. 2008;8(2):121-32.

LEVI F, LA VECCHIA C, RANDIMBISON L, et al. Descriptive epidemiology of soft tissue sarcomas in Vaud, Switzerland. **Eur J Cancer.** 1999;35:1711-6.

LIU X, CAI H, HUANG H, et al. The prognostic significance of apoptosis-related biological markers in Chinese gastric cancer patients. **PLoS One.** 2011;6(12):e29670.

MADOZ-GÚRPIDE J. Targeting sarcomas by proteomic approaches. **Proteomics Clin Appl.** 2009;3(7):758-73.

MANKIN HJ, MANKIN CJ, SIMON MA. The hazards of the biopsy, revisited. **J Bone Joint Surg Am.** 1996;78:656-63.

MANOEL WJ, DE PAULA CI, DE CONTI RC, et al. Sarcomas de Partes Moles: análise de 73 casos. **Acta Oncol Bras.** 1988;8(3):117-20.

MANOEL WJ, SARMENTO BJ, JÚNIOR LP, et al. Sarcomas de Partes Moles: Resultados do Tratamento dos Tumores de Baixo Grau. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 2008;54(1):17-24.

MARCHIO C and REIS-FILHO J. Molecular diagnosis in breast cancer. **Diagnostic Histopathology.** 2008;14(5):202-213.

MARTIN RG. Soft tissue sarcomas. In: Clark RL and Howe CD (eds). **Cancer patient care.** Chicago: Year Book Medical, 1976, p. 473-83.

MCPAKE CR, TILLMAN DM, POQUETTE CA, et al. Bax is an important determinant of chemosensitivity in pediatric tumor cell lines independent of Bcl-2 expression and p53 status. **Oncol Res.** 1998;10(5):235-44.

MIETTINEN M. From morphological to molecular diagnosis of soft tissue tumors. **Adv Exp Med Biol.** 2006;587:99-113.

NAKANISHI H, OHSAWA M, NAKA N, et al. Immunohistochemical detection of bcl-2 and p53 proteins and apoptosis in soft tissue sarcoma: their correlations with prognosis. **Oncology.** 1997;54(3):238-44.

NORTON AJ, JORDAN S, YEOMANS P. Brief, high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed tissues. **J Pathol.** 1994;173(4):371-9.

OLA MS, NAWAZ M, AHSAN H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Mol Cell Biochem.** 2011;351(1-2):41-58.

OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell.** 1993;74(4):609-19.

OTTAIANO A, DE CHIARA A, FAZIOLI F, et al. Biological prognostic factors in adult soft tissue sarcomas. **Anticancer Res.** 2005;25(6C):4519-26.

PISTERS PW, HARRISON LB, WOODRUFF JM, et al. A prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in the management of low-grade soft tissue sarcomas of the extremity and superficial trunk. **J Clin Oncol.** 1994;12(6):1150-5.

PISTERS PW, LEUNG DH, WOODRUFF J, et al. Analysis of prognostic factors in 1,041 patients with localized soft tissue sarcomas of the extremities. **J Clin Oncol.** 1996;14:1679-89.

RAMANATHAN RC, A'HERN R, FISHER C, et al. Modified staging system for extremity soft tissue sarcomas. **Ann Surg Oncol.** 1999;6:57-69.

RCBPGO: Registro de Câncer de Base Populacional em Goiás, **Relatório interno.** Goiânia: ACCG, 2008.

RENAULT TT and MANON S. Bax: Addressed to kill. **Biochimie.** 2011;93(9):1379-91.

RIEDL SJ and SALVESEN GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2007;8(5):405-13.

RYDHOLM A. Improving the management of soft tissue sarcoma: diagnosis and treatment should be given in specialist centers. **BMJ.** 1998;317(7151):93-4.

SABAH M, CUMMINS R, LEADER M, et al. Immunoreactivity of p53, Mdm2, p21(WAF1/CIP1) Bcl-2, and Bax in soft tissue sarcomas: correlation with histologic grade. **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** 2007;15(1):64-9.

SAUTER G and MIRLACHER M. Tissue microarrays for predictive molecular pathology. **J Clin Pathol.** 2002;55(8):575-6.

SCHULER M and GREEN DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. **Biochem Soc Trans.** 2001;29(6):684-8.

SCHUYER M, VAN DER BURG ME, HENZEN-LOGMANS SC, et al. Reduced expression of BAX is associated with poor prognosis in patients with epithelial

ovarian cancer: a multifactorial analysis of TP53, p21, BAX and BCL-2. **Br J Cancer**. 2001;85(9):1359-67.

SINGER S, DEMETRI GD, BALDINI EH. Management of soft tissue sarcomas: An overview and update. **Lancet Oncol**. 2000;1:75-85.

STOJADINOVIC A, LEUNG DH, ALLEN P, et al. Primary adult soft tissue sarcoma: time dependent influence of prognostic variables. **J Clin Oncol**. 2002;20:4344-52.

SUEHARA Y. Proteomic analysis of soft tissue sarcoma. **Int J Clin Oncol**. 201;16(2):92-100.

SUN B, SUN Y, WANG J, et al. Extent, relationship and prognostic significance of apoptosis and cell proliferation in synovial sarcoma. **Eur J Cancer Prev**. 2006;15(3):258-65.

TAYLOR AC, SCHUSTER K, MCKENZIE PP, et al. Differential cooperation of oncogenes with p53 and Bax to induce apoptosis in rhabdomyosarcoma. **Mol Cancer**. 2006;5:53.

TSCHOEP K, KOHLMANN A, SCHLEMMER M, et al. Gene expression profiling in sarcomas. **Crit Rev Oncol Hematol**. 2007;63(2):111-24.

TSUJIMOTO Y, YUNIS J, ONORATO-SHOWE L, et al. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. **Science**. 1984;224(4656):1403-6.

UICC: International Union Against Cancer. **TNM: classification of malignant tumors**. 6th ed. New York: Wiley-Liss, 2002.

VODUC D, KENNEY C, NIELSEN TO. Tissue Microarrays in Clinical Oncology. **Semin Radiat Oncol.** 2008;18(2):89-97.

WEI MC, ZONG WX, CHENG EH, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science.** 2001;292(5517):727-30.

YIN XM, OLTVAI ZN, KORSMEYER SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. **Nature.** 1994;369(6478):321-3.

YOULE RJ and STRASSER A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2008;9(1):47-59.

ZAHM SH and FRAUMENI JF Jr. The epidemiology of soft tissue sarcoma. **Semin Oncol.** 1997;24(5):504-14.

ZHANG H, SALTO-TELLEZ M, PUTTI TC, et al. Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. **Mod Pathol.** 2003;16(1):79-84.

7 ANEXOS

7.1 Anexo 1 - Classificação de Sarcomas de Partes Moles Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS)

| GRUPOS | TUMORES | CÓDIGO |
|--|--|--------|
| TUMORES GORDUROSOS | Lipossarcoma Desdiferenciado | 8858/3 |
| | Lipossarcoma Mixóide | 8852/3 |
| | Lipossarcoma de Células Redondas | 8853/3 |
| | Lipossarcoma Pleomórfico | 8854/3 |
| | Lipossarcoma Mixóide | 8855/3 |
| | Lipossarcoma, não especificado | 8850/3 |
| TUMORES FIBROBLASTICOS / MIOFIBROBLASTICOS | Fibrossarcoma do Adulto | 8810/3 |
| | Mixofibrossarcoma | 8811/3 |
| | Sarcoma Fibromixóide de Células Fusiformes Hialinizantes de Baixo Grau | 8811/3 |
| | Fibrossarcoma epitelióide esclerosante | 8810/3 |
| TUMORES FIBROHISTIOCITICOS | Fibrohistiocitoma maligno pleomórfico / Sarcoma pleomórfico indiferenciado | 8830/3 |
| | Fibrohistiocitoma maligno de células gigantes / Sarcoma pleomórfico indiferenciado de células gigantes | 8830/3 |
| | Fibrohistiocitoma maligno inflamatório / Sarcoma pleomórfico indiferenciado com proeminente inflamação | 8830/3 |
| | | 8830/3 |
| TUMORES DE MUSCULOS LISOS | Leiomiomasarcoma (excluindo pele) | 8890/3 |
| TUMORES PERIVASCULARES (PERICITICOS) | Tumor glômico maligno | 8711/3 |
| TUMORES DE MUSCULOS ESQUELÉTICOS | Rabdomiossarcoma embrionário (incl. células fusiformes, botrioide, anaplásico) | 8910/3 |
| | | 8912/3 |
| | Rabdomiossarcoma Alveolar (Incluindo: sólido, anaplásico) | 8910/3 |
| | Rabdomiossarcoma pleomórfico | 8920/3 |
| | 8901/3 | |
| TUMORES VASCULARES | Sarcoma de Kaposi | 9140/3 |
| | Hemangioendotelioma epitelióide | 9133/3 |
| | Angiossarcoma de partes moles | 9120/3 |
| TUMORES DE DIFERENCIAÇÃO INCERTA | Sinoviossarcoma | 9040/3 |
| | Sarcoma epitelióide | 8804/3 |
| | Sarcoma alveolar de partes moles | 9581/3 |
| | Sarcoma de células claras de partes moles | 9044/3 |
| | Condrossarcoma mixóide extraesquelético | 9231/3 |
| | PNET / Tumor de Ewing extraesquelético pPNET | |
| | Tumor de Ewing extraesquelético | 9364/3 |
| | Tumor desmoplásico de células redondas pequenas | 9260/3 |
| | Tumor rabdóide extrarenal | 8806/3 |
| | Mesenquimoma maligno | |
| | Neoplasias com diferenciação de células claras perivascular | 8963/3 |
| Tumor miomelanocítico de células claras | 8800/3 | |

Traduzido, baseado em Fletcher et al.(2002).

**7.2 Anexo 2 - Translocações cromossômicas comumente encontradas
em sarcomas de partes moles**

| Tumor | Translocação | Produto da Fusão |
|---|---|--|
| Rabdomiossarcoma alveolar | t(2;13)(q35;q14) | PAX3 : FOXO1A |
| | t(1;13)(p36;q14) | PAX7 : FOXO1A |
| Sarcoma de partes moles alveolar | t(X;17)(p11;q25) | TFE3 : ASPL |
| Fibro-histiocitoma angiomatóide | t(12;16)(q13;p11) | FUS : ATF1 |
| Sarcoma de células claras | t(12;22)(q13;q12) | EWS : ATF1 |
| Fibrossarcoma (Nefroma mesoblástico congênito) | t(12;15)(p13;q25) | ETV6 : NTRK3 |
| Dermatofibrossarcoma protuberante | t(17;22)(q22;q13) | COL1A1 : PDGFB |
| Tumor desmoplásico de pequenas células | t(11;22)(p13;q12) | EWS:WT1 |
| Sarcoma estromal endometrial | t(7;17)(p15;q21) | JAZF1 : JJAZ1 |
| Sarcoma de Ewing Tumor Neuroectodermal primitivo | t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12) t(17;22)(q12;q12) t(2;22)(q33;q12) | EWS : FLI1 EWS : ERG EWS : ETV1 EWS : E1AF EWS : FEV |
| Condrossarcoma mixóide extra-esquelético | t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11) t(9;15)(q22;q21) | EWS : NR4A3 RBP56 : NR4A3 TCF12 : NR4A3 |
| Sarcoma fibromixóide de baixo grau | t(7;16)(q33;p11) t(11;16)(p11;p11) | FUS : CREB3L2 FUS : CREB3L1 (rare) |
| Tumor miofibroblástico inflamatório | t(1;2)(q22;p23) t(2;19)(p23;p13) t(2;17)(p23;q23) t(2;2)(p23;q13) | TPM3 : ALK TPM4 : ALK CLTC : ALK RANBP2 : ALK |
| Lipossarcoma mixóide | t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(p13;q12) | FUS : DDIT3 EWS : DDIT3 |
| Sinoviossarcoma | t(X;18)(p11;q11) | SS18 : SSX1 SS18 : SSX2 SS18 : SSX4 (raro) |

Traduzido, baseado em Antonescu (2006).

7.3 Anexo 3 - Ficha de coleta de dados clínico-patológicos de SPM –

Hospital Araújo Jorge – ACCG

BANCO DE DADOS RETROSPECTIVO
SARCOMAS DE PARTES MOLES
HOSPITAL ARAÚJO JORGE –ACCG
DEPARTAMENTO DE TECIDO CONJUNTIVO E ORTOPEDIA

Número

I. IDENTIFICAÇÃO

1. Prontuário: _____ 2. Nome: _____
3. Data de nascimento: ____/____/____ 4. Sexo: 1. Masc 2. Fem 5. Idade: _____

II. LOCALIZAÇÃO/DIAGNÓSTICO/ESTADIAMENTO

6. Localização: 1. cabeça e pescoço 2. tórax 3. parede abdominal 4. retroperitônio 5. pelve
 6. intra-abdominal 7. membro superior 8. membro inferior 9. outros: _____
7. Biópsia fora: 1. Sim Não 8. Cirurgia fora: 1. Sim 2. Não 9. Dor local: 1. Sim 2. Não
10. Histologia/IHQ: 1. fibrossarcoma 2. FHM 3. lipossarcoma 4. leiomiossarcoma 5. rabdomiossarcoma
 6. linfangio/ssarcoma 7. Kaposi 8. sarcoma sinovial 9. sarcoma epitelióide
 10. TON 11. GIST 12. Ewing 12. PNET 13. paraganglioma
 14. sarcoma alveolar 15. sarcoma SOE 16. outros: _____
11. Estadiamento: _____ 12. Tamanho: _____ cm 13. Linfonodos: 1. Sim 2. Não
14. Grau: 1. baixo 2. alto 15. Metástase: 1. Sim 2. Não 16. Ressecção de metástase: 1. Sim 2. Não
17. Sítio metastático: 1. pulmão 2. fígado 3. cérebro 4. osso 5. NA 6. outros: _____

III. NEOADJUVÂNCIA

18. Radioterapia neoadjuvante: 1. Sim 2. Não 19. Dose: _____ Gy
20. Quimioterapia neoadjuvante: 1. Sim 2. Não 21. Droga principal: _____

IV. TRATAMENTO CIRÚRGICO

22. Cirurgia: 1. Preservação 2. Amputação/ressec. órgão 22. Margem: 1. livre 2. comprometida 3. NA
23. Complicações: 1. Sim 2. Não 24. Tipo: 1. Infecção 2. Deiscência 3. outras: _____

V. ADJUVÂNCIA/TRATAMENTO EXCLUSIVO CURATIVO

25. Radioterapia adjuvante: 1. Sim 2. Não 26. Dose: _____ Gy
27. Quimioterapia adjuvante: 1. Sim 2. Não 28. Droga principal: _____

29. Trat. paliativo inicial: 1. Sim 2. Não 30. Tipo: 1. RT 2. QT 3. Cirurgia 4. Combinado: _____

VI. EVOLUÇÃO

30. Recorrência: 1. Sim 2. Não 31. Padrão: 1. local 2. local+distância 3. distância
32. Sítio metastático: 1. pulmão 2. fígado 3. cérebro 4. osso 5. não 6. outros: _____
33. Ressecção de metástase: 1. Sim 2. Não 34. Tempo para recorrência: _____ meses
35. Situação atual: 1. vivo s/doença 2. vivo c/doença 3. perda de seguimento 4. óbito
36. Tempo de seguimento _____ meses 37. Admissão: ____/____/____ 38. Última consulta: ____/____/____

Apenas sarcomas de partes moles. Se tratamento paliativo(29), apenas itens I, II e VI36-39. NA=não avaliável; TON=tumor de origem neural; GIST= tumor estromal gastrointestinal; PNET=tumor neuroectodérmico

7.4 Anexo 4 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (CEPACCG).

049/09

PROCOLO CEP/ACCG Nº 049/09

Goiânia, 05/11/2009

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dr. Wilmar José Manoel

Orientadora: Maria Alves Barbosa

TÍTULO: “Imunodeteção das proteínas p53, mdm2, p21waf1/cip1, bcl-2 e bax em sarcomas de partes moles no adulto”.

Área Temática: Grupo III

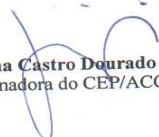
Área de Conhecimento: Ciências da Saúde/Medicina

Local de Realização: Hospital Araújo Jorge/ACCG - Serviço de Tecido Conjuntivo e Anatomia Patológica.

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, **relatórios semestrais** do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).


Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi
Coordenadora do CEP/ACCG



ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

(62) 3878-7000 | 3243-7000
Rua 239, nº 206, St. Universitário
Goiânia - Goiás - Brasil - CEP 74.605-070
www.accg.org.br