

Correlação da expressão imunoistoquímica de β -catenina, CDX2 e c-MYC com a agressividade no osteossarcoma

Correlation of immunohistochemical expression of β -catenin, CDX2 and c-MYC with aggressiveness in osteosarcoma

Cássio Zini¹, Paulo Afonso Nunes Nassif², Fernando Issamu Tabushi¹, Ana Maria Waaga-Gasser^{2,3}, Martin Gasser⁴, Jorge Alberto Langbeck Ohana⁵, Igor Lima Maldonado⁵, Carmen Austrália Paredes Marcondes Ribas¹

RESUMO

Introdução: Osteossarcoma é neoplasia maligna agressiva, de origem mesenquimal, encontrado frequentemente em regiões metafisárias de ossos longos. A sobrevida geral em 5 anos é de aproximadamente 65%, sendo as metástases pulmonares as principais causas de óbito. Os biomarcadores ou marcadores tumorais podem ser capazes de prever o comportamento futuro de neoplasia maligna.

Objetivo: Investigar a expressão imunoistoquímica das proteínas β -catenina, CDX2 e c-MYC em amostras de osteossarcoma e correlacionar a expressão das proteínas β -catenina, CDX2 e c-MYC dos tecidos com a idade ao diagnóstico, tempo de sobrevida e doença metastática.

Método: Estudo observacional, longitudinal, prospectivo histórico tendo sido selecionados 64 casos de osteossarcoma realizando imunoistoquímica para os marcadores β -catenina, CDX2 e c-MYC em 28 amostras. Dados clínicos foram coletados e tabulados. Através da técnica TMA (tissue microarray) os tecidos foram submetidos à imunoistoquímica pela técnica de peroxidase. As informações clínico-epidemiológicas foram cruzadas com o resultado obtido pela imunomarcção e feita análise estatística.

Resultado: Dos pacientes 14 eram mulheres e 14 homens. Evoluíram com metástases 50%. Cinco de 27 (18,5%) com osteossarcoma de alto grau positivaram para β -catenina; destes, 80% evoluíram com metástase e tinham no máximo 20 anos de idade. Não houve marcação imunoistoquímica positiva para CDX2 e a sobrevida para pacientes com marcação negativa foi de 48%. A expressão do c-MYC foi associada à mortalidade de 50% e não foi detectada em pacientes na faixa etária de 5-20 anos de idade. A sobrevida em 5 anos foi em 46,7%. O tempo de seguimento máximo foi de 133 meses. A disseminação metastática pulmonar ocorreu em 92,9% dos 14 que evoluíram com metástases. A localização tumoral foi de 75% em MMII, 21,4% em MMSS e um caso em pelve.

Conclusão: Houve expressão imunoistoquímica das proteínas β -catenina e c-MYC enquanto que o CDX2 não foi marcado em nenhum dos casos. Não foi possível correlacionar a expressão imunoistoquímica das proteínas β -catenina, CDX2 e c-MYC com idade ao diagnóstico, tempo de sobrevida e doença metastática.

PALAVRAS-CHAVE: Osteossarcoma. β -catenina. CDX2. c-MYC. Biomarcador. Imunoistoquímica.

Mensagem Central

Osteossarcoma é neoplasia maligna agressiva, de origem mesenquimal, encontrado frequentemente em regiões metafisárias de ossos longos. A sobrevida geral em 5 anos é de aproximadamente 65%, sendo as metástases pulmonares as principais causas de óbito. Os biomarcadores ou marcadores tumorais podem ser capazes de prever o comportamento futuro de neoplasia maligna. É o que esta pesquisa procurou demonstrar.

Perspectiva

O papel dos marcadores biológicos em osteossarcoma ainda é incerto, pois apenas um pequeno número deles foi avaliado de maneira adequada. Apresenta-se como perspectiva futura a possibilidade de detecção precoce do osteossarcoma por meio desses marcadores. A grande questão para o futuro é responder a uma pergunta antiga: "Qual destas proteínas serve para auxiliar na previsão prognóstica e na ação terapêutica?"

ABSTRACT

Introduction: Osteosarcoma is an aggressive malignant neoplasm of mesenchymal origin, frequently found in metaphyseal regions of long bones. The overall 5-year survival rate is approximately 65%, with lung metastases being the main cause of death. Biomarkers or tumor markers may be able to predict the future behavior of malignant neoplasia.

Objective: To investigate the immunohistochemical expression of β -catenin, CDX2 and c-MYC proteins in osteosarcoma samples and to correlate the expression of β -catenin, CDX2 and c-MYC proteins in tissues with age at diagnosis, survival time and metastatic disease.

Method: Observational, longitudinal, prospective historical study. Sixty-four cases of osteosarcoma were selected and immunohistochemistry for β -catenin, CDX2 and c-MYC markers was performed in 28 samples. Clinical data were collected and tabulated. Using the TMA (tissue microarray) technique, the tissues were subjected to immunohistochemistry using the peroxidase technique. The clinical and epidemiological information was compared with the results obtained by immunostaining and statistical analysis was performed.

Results: Fourteen patients were women and 14 men. 50% developed metastases. Five of 27 (18.5%) with high-grade osteosarcoma tested positive for β -catenin; of these, 80% developed metastases and were 20 years of age or younger. There was no positive immunohistochemical staining for CDX2 and the survival rate for patients with negative staining was 48%. c-MYC expression was associated with a 50% mortality rate and was not detected in patients aged 5-20 years. The 5-year survival rate was 46.7%. The maximum follow-up time was 133 months. Pulmonary metastatic dissemination occurred in 92.9% of the 14 patients who developed metastases. Tumor location was in 75% of the lower limbs, 21.4% in the upper limbs and one case in the pelvis.

Conclusion: There was immunohistochemical expression of β -catenin and c-MYC proteins, while CDX2 was not labeled in any of the cases. It was not possible to correlate the immunohistochemical expression of β -catenin, CDX2 and c-MYC proteins with age at diagnosis, survival time and metastatic disease.

KEYWORDS: Osteosarcoma. β -catenin. CDX2. c-MYC. Biomarker. Immunohistochemistry.

¹Instituto Presbiteriano Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil;

²Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA;

³Harvard Medical School, Boston, MA, USA;

⁴Hospital Unimed Prime, Belém, Pará, Brasil;

⁵University De Tours, Tours, França.

Conflito de interesse: Nenhum | Financiamento: Em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001 | Recebido em: 17/07/2024 | Aceito em: 22/10/2024 | Correspondência: cassiozini84@gmail.com | Editor Associada: Nerlan Tadeu Gonçalves de Carvalho⁵

Como citar:

França VCP, Amaral NIO, de Biagi J, Gasperin-Junior P. Avaliação da função sexual de puérperas em diferentes vias de parto: vaginal e cesárea. BioSCIENCE. 2024;82:e061

INTRODUÇÃO

Osteossarcoma é a neoplasia óssea primária mais comum, estando à frente dos sarcomas de Ewing e condrossarcomas; tem maior prevalência em crianças e adultos jovens com pico de incidência na segunda década de vida e pequena predileção pelo sexo masculino.¹ É neoplasia maligna agressiva, de origem mesenquimal, caracterizada por formação irregular de osso imaturo, produção de matriz osteoide e células fusiformes estromais malignas.² Apesar de poder comprometer qualquer osso, os osteossarcomas são encontrados frequentemente em regiões metafisárias de ossos longos, sendo as regiões próximas ao joelho (extremidade distal do fêmur e proximal da tíbia), responsáveis por mais de 50% das ocorrências.³ A sobrevida geral em 5 anos é de aproximadamente 65-75%, sendo as metástases pulmonares as principais causas de óbito.² A sobrevida em 5 anos nos osteossarcomas localizados é de 60-80%. Estes tumores são mais susceptíveis de serem curados se forem ressecáveis, isto é, se todo o tumor for corretamente identificado e puder ser retirado cirurgicamente. Se ele já está disseminado no momento do diagnóstico a sobrevida em 5 anos despenca para 15-30%. Caso a doença se dissemine apenas para os pulmões e se a metastasectomia pulmonar for possível, a sobrevida pode chegar a 40%.⁴ Os osteossarcomas podem ser primários ou secundários. Estes últimos são formas que ocorrem em ossos afetados por anormalidades pré-existentes, como doença de Paget e radioterapia prévia.⁵

Atualmente, os meios para prever evolução para metástase e prognóstico ainda são pouco encontrados na literatura, provavelmente porque os mecanismos de carcinogênese ainda não estão totalmente esclarecidos e também devido à falta de indicadores precisos para o prognóstico. Vários marcadores séricos foram investigados por sua utilidade no diagnóstico e acompanhamento na progressão e recorrência da doença.⁶

A etiologia do osteossarcoma é complexa e não é bem compreendida. As patogenias moleculares e a genética do tumor são vastas e muito heterogêneas, com discrepâncias na literatura sobre suas influências demográficas e ambientais, dificultando a sua compreensão.⁷

A catenina beta-1, também conhecida como β -catenina, é proteína que em seres humanos é codificada pelo gene CTNNB1. Mutações deste gene são comumente encontradas em uma variedade de tumores. Estima-se que aproximadamente 10% de todas as amostras de tecido sequenciadas de todos os tumores exibam mutações no gene CTNNB1. Também se observaram aumentos dos níveis de β -catenina nuclear nos carcinoma basocelular, epidermoide de cabeça e pescoço, próstata, pilomatrixoma e meduloblastoma. Devido ao seu envolvimento no desenvolvimento do câncer, a inibição da β -catenina continua a receber atenção significativa.⁸

O CDX2 (caudal type homeobox transcription factor 2) é fator de transcrição nuclear intestinal e age como importante regulador de genes específicos envolvidos na proliferação e diferenciação das células intestinais. Esta proteína também desempenha papel no desenvolvimento

embrionário inicial do trato intestinal. A expressão aberrante desse gene está associada à inflamação intestinal e à tumorigênese.

A proteína c-MYC é superexpressa na maioria das neoplasias em humanos e contribui para a causa de pelo menos 40% dos tumores.⁹ O gene c-MYC foi descoberto como resultado de estudos iniciais de tumores de galinha muito agressivos (leucemia e sarcomas). A translocação do c-MYC está associada ao desenvolvimento de mieloma múltiplo.¹⁰

Nas últimas duas décadas, a melhor compreensão da biologia do câncer permitiu progresso notável no manejo clínico dessa doença. Isso é resultado do crescente conhecimento sobre as estruturas moleculares e vias de sinalização de receptores biológicos, o que levou ao desenvolvimento de diversas terapias alvo. Grande número de marcadores tumorais está sob investigação em ensaios clínicos, procurando dar visão geral para diagnósticos e tratamentos específicos, com ênfase sobre os mecanismos, aplicabilidade clínica e perspectivas futuras.⁹

Os biomarcadores ou marcadores tumorais podem ser capazes de prever o comportamento futuro de uma neoplasia maligna. São complementares à clínica e aos exames de imagem e anatomopatológico, permitindo informações adicionais sobre o grau de malignidade. Podem ser dosados em vários níveis, do molecular ao macroscópico e de maneira individual ou em conjunto para traçar perfil da neoplasia. Apesar de não existir marcador tumoral ideal, específico e sensível o suficiente, sua utilização na prática clínica é ampla: avaliação de risco, rastreamento, diagnóstico diferencial, predição e especialmente no prognóstico e monitoramento.

Os objetivos deste estudo foram investigar a expressão imunohistoquímica das proteínas β -catenina, CDX2 e c-MYC em amostras de osteossarcoma, e correlacionar suas expressões nos tecidos contendo osteossarcoma com idade ao diagnóstico, tempo de sobrevida e metástase.

MÉTODO

Esta pesquisa foi realizada pelo Instituto Presbiteriano Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil, em parceria com Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School Molecular Oncology and Immunology and Renal Division. Ela foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba, sob parecer CAAE 69385417.7.1001.0103 estando de acordo com os preceitos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde (CNS/MS), e seguiram-se as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa em seres humanos, Resolução 196/96 (1995) Resolução 251 (1997) Resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Obtenção e seleção da amostra

Foram selecionados 64 casos de osteossarcoma utilizando o sistema de prontuário eletrônico Tasy. Também foi realizada revisão dos prontuários físicos e de laudos anatomopatológicos. A busca inicial foi através do CID-10 C40 referente a osteossarcoma.

Variáveis relativas ao paciente

Foi criado um protocolo padronizado que era constituído pelas seguintes variáveis: idade ao diagnóstico, sexo, número de tumores, número do bloco de parafina, diagnóstico histológico, local do tumor primário, data do diagnóstico, presença de metástases, local da metástase ao diagnóstico quando houvesse, progressão da doença, tempo de seguimento, tempo de sobrevivência e datas da última avaliação e do óbito.

Alguns pacientes, mesmo na vigência do tratamento, apresentam refratariedade ou recorrência da neoplasia. A progressão também cursa com piora do estadiamento clínico, seja por retorno do tumor no sítio cirúrgico ou aparecimento de metástase local ou à distância, em vísceras, linfonodos ou osso. Foi considerada refratariedade quando, mesmo com o tratamento empregado, o paciente permaneceu com sinais e sintomas da neoplasia primária e, portanto, não apresentou intervalo de tempo livre da doença. Já a recidiva foi entendida quando, após determinado período de tempo sem qualquer manifestação da doença, o paciente voltou a apresentar o câncer.

Tempo de seguimento

Subtraiu-se a data do diagnóstico do osteossarcoma pela data em que o paciente foi avaliado pela última vez, seja no ambulatório ou por contato telefônico, para pacientes vivos; e subtraiu-se a data do diagnóstico pela data do óbito para pacientes que não sobreviveram.

O tempo de sobrevivência foi calculado em todos os pacientes com intervalos distintos de tempo (1, 2 e 5 anos), entendendo-se que o tempo padronizado para sobrevivência em neoplasias seja de 5 anos. Para os aqueles vivos que não alcançaram este tempo de seguimento, realizou-se projeção estatística que simulava o acompanhamento por 5 anos e, assim, calculou-se a sobrevivência. Para os que não sobreviveram, subtraiu-se a data em que foi realizado o diagnóstico com a do óbito.

Classificação do osteossarcoma

Foi realizada a classificação de cada tumor em alto ou baixo grau, de acordo com o tipo histológico de cada osteossarcoma.

Após a seleção inicial foi realizada a busca dos respectivos blocos de parafina; foram selecionados somente os que possuíam massa tumoral suficiente para que fossem realizados cortes adicionais sem que se usasse totalmente o material biológico. As lâminas foram reavaliadas por um segundo patologista independente, cego para a história clínica, com intuito de confirmar o diagnóstico de osteossarcoma.

Para os blocos que não possuíam lâmina de hematoxilina-eosina, foi requisitada a produção de uma. Nos casos em que havia mais de um bloco, o patologista escolhia o que possuísse maior massa neoplásica. Os blocos devidamente checados eram enviados ao laboratório Infolaudo Anatomia Patológica em Itajaí, SC, Brasil, referência em patologia que realizou a imunomarcagem para os biomarcadores β -catenina, CDX2 e c-MYC.

Critérios de inclusão

Foram selecionados pacientes atendidos no Serviço de Oncologia Clínica, Oncologia Pediátrica e Oncologia Ortopédica do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, PR, Brasil, sem nenhum tratamento prévio. Todos iniciaram a investigação e estadiamento prévio no serviço e que contivessem: dados epidemiológicos completos no prontuário; confirmados por segundo patologista; e com blocos de parafina que possuíam massa tumoral suficiente passível de novos fracionamentos sem que se usasse totalmente o material biológico.

Critérios de exclusão

Pacientes com diagnóstico de osteossarcoma que receberam tratamento anterior ao internamento ou já haviam sido submetidos a tratamento cirúrgico. Excluiu-se blocos de má qualidade ou com falta de material para análise do microarranjo de tecido (TMA) após ser realizado o desgaste do bloco de parafina.

Técnica de confecção dos blocos multiamostrais (BMA) e imunistoquímica

Identificada as áreas do carcinoma, foi selecionada a região dos blocos de parafina representativa para construção dos blocos multiamostrais (TMA – tissue microarray). Utilizou-se aparelho manual para confecção dos BMA que continha pinças acopladas com diâmetros de 1-3 mm, responsáveis pela extração da área desejada para imunistoquímica. A técnica completa para a montagem dos blocos multiamostrais seguiu os passos conhecidos para sua execução.

As lâminas obtidas a partir do TMA foram submetidas à técnica da imunoperoxidase, realizada em instrumento Benchmark UltraTM, com processamento 3 em 1 integrado, compreendendo a desparafinização, reidratação e recuperação antigênica, com tampões Cell Conditioning 1 (pH alto) e Cell Conditioning 2 (pH baixo). O processamento foi todo realizado em plataforma automatizada Ventana Benchmark UltraTM utilizando os anticorpos anti-CTNNB1, anti-CDX2 e anti-c-MYC (Tabela 1). Controles positivos internos e externos atestaram a fidelidade das reações.

Após a imunomarcagem as lâminas de TMA foram laudadas no microscópio Olympus CX31 por 2 patologistas diferentes, em tempos diferentes, seguindo parâmetros para positividade e negatividade. Para ser positiva a amostra deveria: 1) para β -catenina, ter marcação na superfície interna da membrana celular e membrana nuclear; para CDX2, presença de marcação no núcleo celular; para o c-MYC, expressado no núcleo celular. Foi considerada marcação negativa quando o anticorpo não foi visualizado em nenhuma localização histológica, ou seja, ausência de marcação. Foi considerado inconclusivo quando não houve a possibilidade de realizar a leitura da lâmina devido à qualidade inadequada da amostra.

Análise estatística

Os resultados de idade foram descritos por média, desvios-padrão, mínimo e máximo. Variáveis categóricas foram descritas por frequências e percentuais. Para a descrição do tempo de sobrevivência foram apresentadas

TABELA 1 — Descrição dos anticorpos primários com seus respectivos fabricantes e diluições

Proteína	Anticorpo	Marca	Especificação	Diluição	Código do produto
CDX2	Anti-CDX2, policlonal	Cloud-Clone Corp	APC	1:100	PAC370Hu01
c-MYC	Anti-c-MYC, cloneMYC275+MYC909	Medaysis	AMR	1:100	MC0134
β-catenina	Anti-CTNNB1, monoclonal	LSBio	AMR	1:50	LS-C311950/77007

AMR = Anticorpo monoclonal de rato, APC = Anticorpo policlonal de coelho; AMC, Anticorpo monoclonal de coelho.

curvas de Kaplan-Meier. Inicialmente, foi avaliada a associação entre a expressão de cada um dos marcadores e cada uma das variáveis idade (até 20 anos ou mais de 20 anos), localização do tumor (membro inferior, membro superior ou axial) e presença de metástase. Para cada uma das variáveis e para cada marcador analisado, testou-se a hipótese nula de que não há associação entre a variável e o marcador, vs. a hipótese alternativa de que havia associação. Para esta análise foram usados o teste exato de Fisher ou teste de qui-quadrado. Em seguida, para as comparações das classificações da expressão dos marcadores, em relação ao tempo de sobrevida, foi usado o teste de Log-rank. Em função do pequeno número de casos, não foram apresentadas medidas de associação. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Stata v.¹⁴

RESULTADOS

Dos 28 pacientes em seguimento - 14 mulheres e 14 homens - 16 sobreviveram e 12 morreram. Destes 16 pacientes sobreviventes, o tempo médio de seguimento foi de 5 anos e o paciente com mais tempo atingiu 11 anos. Os óbitos ocorreram em 6 homens e 6 mulheres. A amostra foi composta por indivíduos entre 10-62 anos, idade em que foi confirmado o diagnóstico de osteossarcoma; 60% se enquadraram dentro da faixa etária de 5-20 anos e apenas 2 (7%) com mais de 60 anos (Tabela 2).

TABELA 2 — Variáveis relativas aos pacientes (n = 28)

Variável	n	Classificação	Resultado*
Idade ao diagnóstico (anos)	28		23 ± 13,4 (10 - 62)
Idade ao diagnóstico (anos)	28	Até 20	17 (60,7)
		Mais de 20	11 (39,3)
Sexo	28	Feminino	14 (50)
		Masculino	14 (50)
Número de lâminas ao longo do período de seguimento	28	1	19 (67,9)
		2, 3 ou 4	9 (32,1)
Óbito	28	Não	16 (57,1)
		Sim	12 (42,9)
Tempo de seguimento (não óbito) (meses)	14		80,0 ± 42,0 (27,5 - 150)
Tempo de sobrevida (óbitos) (meses)	14		18,2 ± 12,1 (2,7 - 42,1)
Tempo de seguimento geral (meses)	28		48,9 ± 43,6 (2,7 - 150)
Metástase	28	Não	14 (50)
		Sim	14 (50)
Local da metástase (por paciente)	14	Pulmão	13 (92,9)
		Linfonodo	1 (7,1)

* Descrito por média ± desvio-padrão (mínimo - máximo) ou por frequência (percentual)

Em 32% dos casos, o osteossarcoma foi encontrado no joelho excluindo-se a patela, no fêmur distal e na tíbia proximal. Em 10,7% dos casos, ele foi encontrado nas metáfises (proximal ou distal) do úmero. No total, 75% dos tumores se localizaram em membros inferiores, 21,4% em superiores e 1 ílaco. Com relação à agressividade 27 casos eram de alto e apenas 1 de baixo grau. O pulmão foi o órgão para o qual a doença preferencialmente se disseminou, 13 das 14 metástases encontradas.

Linfonodos foram responsáveis por 1 caso de doença metastática extrapulmonar. Nove em 13 pacientes com metástase pulmonar evoluíram para óbito; 75% dos óbitos foram relacionados à presença de metástase pulmonar; 3 (25%) morreram sem manifestação à distância da neoplasia. Quatro pacientes com metástase pulmonar e o único com ela linfonodal permaneceram vivos até a conclusão desta pesquisa. Um dos pacientes vivos com metástase pulmonar esteve em seguimento por 118 meses. A média da sobrevida destes pacientes foi de aproximadamente 5 anos.

Dois pacientes apresentaram refratariedade ao tratamento empregado. Um teve 3 biópsias e sobreviveu por 18 meses a partir do diagnóstico inicial; outro, 4 biópsias e 17 meses de sobrevida. Não houve a identificação de nenhum caso de recidiva da doença. Um paciente viveu por apenas 2 meses a partir do diagnóstico de localização pélvica. A média ± desvio-padrão de idade foi de 25,1 ± 3,9 anos em casos que não foram a óbito, e 21,0 ± 3,3 anos nos casos que morreram.

A análise apresentada na Tabela 3 foi realizada com base nos dados de 40 tumores (lâminas) dos 28 pacientes, com frequências e percentuais e para casos com mais de um tumor, são apresentados os tempos decorridos entre as avaliações das lâminas.

TABELA 3 — Número de pacientes e de lâminas analisadas

Número de lâminas	n	%	Tempo entre avaliações das lâminas
1	19	67,9	-
2	7	25,0	Média de 3,5 meses (0,5 a 9,8 meses)
3	1	3,6	Média de 8,2 meses (6,5 a 9,8 meses)
4	1	3,6	Média de 5 meses (2,7 a 7,1 meses)
Total de pacientes	28	100,0	

No Figura1 é apresentada a curva de sobrevida (Kaplan-Meier) dos pacientes a partir do diagnóstico inicial. Demais gráficos apresentados também se utilizaram desta projeção estatística.

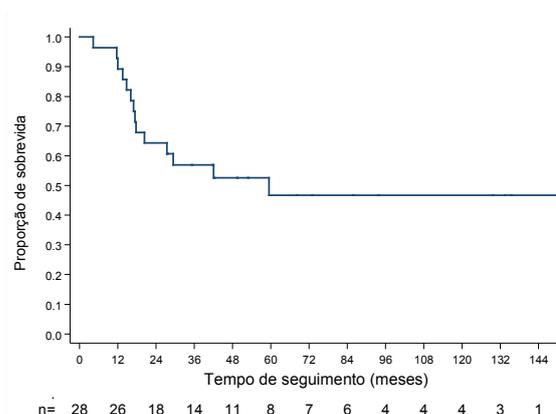


FIGURA 1 — Projeção estatística de sobrevida geral

Na Tabela 4, são apresentados os percentuais de sobrevida em cada tempo estimados por Kaplan-Meier.

TABELA 4 – Sobrevida por tempo de seguimento

Tempo (meses)	% de sobrevida
0 (diagnóstico)	100%
3 meses	100%
6 meses	96,4%
1 ano	92,9%
1,5 ano	67,9%
2 anos	64,3%
3 anos	56,9%
4 anos	52,5%
5 anos	46,7%

Para as análises apresentadas a seguir, foram considerados os dados de 28 lâminas correspondentes aos 28 pacientes.

A Tabela 5 expõe o resultado da marcação dos biomarcadores β -catenina, CDX2 e c-MYC. Algumas leituras imunistoquímicas das expressões de β -catenina, CDX2 e c-MYC foram inconclusivas. Não houve nenhuma marcação positiva para o biomarcador CDX2 nas amostras. Os resultados também foram analisados levando-se em conta apenas as marcações positivas e negativas para os biomarcadores β -catenina e c-MYC.

TABELA 5 – Descritivas dos marcadores

Variável	n	Classificação	n (%)
β -catenina	28	Negativo	18 (64,3)
		Positivo	5 (17,8)
		Inconclusivo	5 (17,8)
β -catenina	23	Negativo	18 (78,3)
		Positivo	5 (21,7)
CDX2	28	Negativo	21 (75,0)
		Inconclusivo	7 (25,0)
c-MYC	28	Negativo	20 (71,4)
		Positivo	2 (7,1)
		Inconclusivo	6 (21,4)
c-MYC	22	Negativo	20 (90,9)
		Positivo	2 (9,1)

Nas Tabelas 6 e 7, são apresentadas estatísticas descritivas das variáveis idade ao diagnóstico e localização do tumor, respectivamente, de acordo com a expressão de cada biomarcador e os valores de p dos testes estatísticos.

TABELA 6 – Marcadores e idade no diagnóstico

Variável	Classificação	n	Idade no diagnóstico (anos)		p*
			Até 20	Mais de 20	
β -catenina	Negativo	18	11 (64,7)	7 (63,6)	0,432
	Positivo	5	4 (23,5)	1 (9,1)	
	Inconclusivo	5	2 (11,8)	3 (27,3)	
β -catenina	Negativo	18	11 (73,3)	7 (87,5)	0,621
	Positivo	5	4 (26,7)	1 (12,5)	
CDX2	Negativo	21	15 (88,2)	6 (54,6)	0,076
	Inconclusivo	7	2 (11,8)	5 (45,5)	
c-MYC**	Negativo	20	15 (88,2)	5 (45,5)	-
	Positivo	2	0 (0)	2 (18,2)	
	Inconclusivo	6	2 (11,8)	4 (36,4)	
c-MYC	Negativo	20	15 (100)	5 (71,4)	0,091
	Positivo	2	0 (0)	2 (28,6)	

* Teste exato de Fisher ou teste de qui-quadrado, p < 0,05; ** negativo x positivo: p = 0,091; (-) Teste não aplicável (frequências muito baixas em alguma classificação do marcador)

TABELA 7 – Marcadores e localização do tumor

Variável	Classificação	n	Localização do tumor			p*
			MI	MS	Axial	
β -catenina	Negativo	18	13 (65)	5 (71,4)	0	0,939
	Positivo	5	4 (20)	1 (14,3)	0	
	Inconclusivo	5	3 (15)	1 (14,3)	1	
β -catenina	Negativo	18	13 (76,5)	5 (83,3)	0	1
	Positivo	5	4 (23,5)	1 (16,7)	0	
CDX2	Negativo	21	16 (80)	5 (71,4)	0	0,633
	Inconclusivo	7	4 (20)	2 (28,6)	1	
c-MYC	Negativo	20	15 (75)	5 (71,4)	0	-
	Positivo	2	1 (5)	1 (14,3)	0	
	Inconclusivo	6	4 (20)	1 (14,3)	1	
c-MYC	Negativo	20	15 (93,8)	5 (83,3)	0	0,480
	Positivo	2	1 (6,3)	1 (16,7)	0	

* Teste exato de Fisher ou teste de qui-quadrado, p < 0,05 (para os testes foi excluída a classificação "axial"); (-) Teste não aplicável (frequências muito baixas em alguma classificação do marcador)

Quanto às associações com sobrevida, na Tabela 8 são apresentados percentuais de óbitos de acordo com a classificação das variáveis e os valores de p dos testes estatísticos. Para cada uma das variáveis analisadas, testou-se a hipótese nula de que não há associação entre a variável e a sobrevida, versus a hipótese alternativa de que há associação.

TABELA 8 – Avaliação de fatores associados a óbito

Variável	Classificação	n	% óbitos	p*
Idade ao diagnóstico (anos)	Até 20	17	10 (58,8%)	0,074
	Mais de 20	11	2 (18,2%)	
Sexo	Feminino	14	6 (42,9%)	0,474
	Masculino	14	6 (42,9%)	
Metástase	Não	14	3 (21,4%)	0,086
	Sim	14	9 (64,3%)	
Localização	MI	20	9 (45,0%)	0,176
	MS	7	2 (28,6%)	
	Axial	1	1	
β -catenina	Negativo	18	6 (33,3%)	0,072
	Positivo	5	3 (60,0%)	
	Inconclusivo	5	3 (60,0%)	
β -catenina	Negativo	18	6 (33,3%)	0,051
	Positivo	5	3 (60,0%)	
CDX2	Negativo	21	9 (42,8%)	0,533
	Inconclusivo	7	3 (42,8%)	
c-MYC	Negativo	20	8 (40,0%)	-
	Positivo	2	1 (50,0%)	
	Inconclusivo	6	3 (50,0%)	
c-MYC	Negativo	20	8 (40,0%)	-
	Positivo	2	1 (50,0%)	

* Teste Log-rank, p < 0,05

Na Figura 2 há a representação da projeção de sobrevida, medida pelo tempo de seguimento, com relação à idade (≤ 20 anos e > 20 anos), ao sexo, ao aparecimento de metástase e à localização do tumor, respectivamente.

DISCUSSÃO

Em relação à amostra

Neste estudo, por motivos metodológicos, principalmente em decorrência da característica prospectiva histórica, ocorreram perdas amostrais relacionadas à dificuldade de interpretação dos resultados pela análise imunistoquímica. Para evitar este fato, seria importante seguir os protocolos dos processos desde

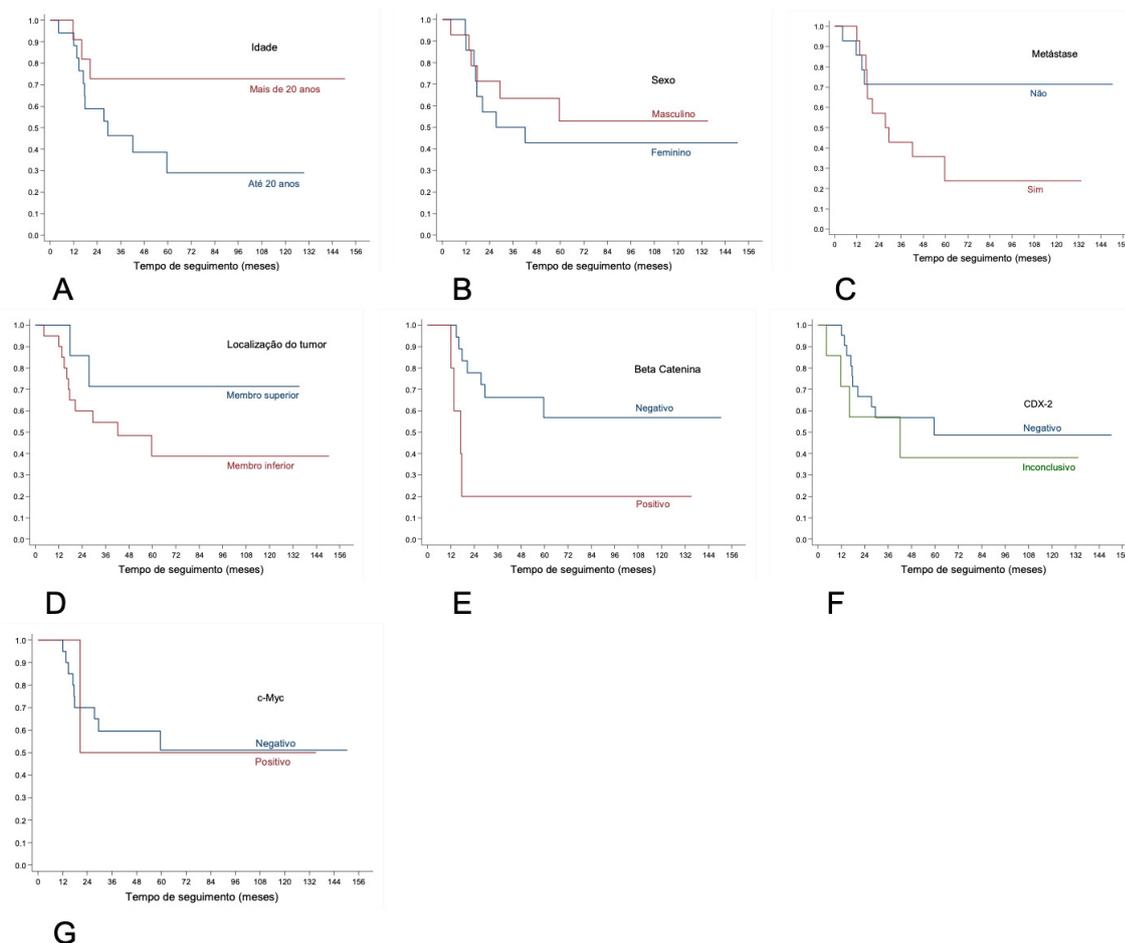


FIGURA 2 — Sobrevida dos pacientes: A) ≤ 20 anos e > 20 anos; B) sexos masculino e feminino; C) com e sem metástase; D) acordo com a localização da neoplasia; E) acordo com a expressão de β -catenina; F) de acordo com a expressão de CDX2; G) de acordo com a expressão de c-MYC

a aquisição do material, passando pelo processo de descalcificação até o preparo do bloco e armazenamento. Material inadequado ou não conservado pode alterar a forma como a imunohistoquímica é realizada. Dependendo da técnica de descalcificação, o tecido ósseo a ser analisado pode perder algumas de suas propriedades, inclusive proteicas, e assim dificultar ou até impedir a análise imunohistoquímica. Muitos dos resultados tidos como inconclusivos foram relacionados a estes fatores.

Deve-se também estar atento à correta identificação do material a ser estudado. O processo mais seguro para a maioria dos casos, é atribuir um número a cada peça, registrar no caderno diário do laboratório ou em sua base de dados no computador, onde constam a descrição, data e técnicas utilizadas, entre outros. Este processo auxiliaria na busca do material.

Quanto às descritivas de variáveis demográficas e clínicas

Faixa etária

Segundo Becker et al.¹ os osteossarcomas têm maior prevalência em crianças e adultos jovens com pico de incidência na segunda década de vida. Da mesma forma, Mirabello, Troisi e Savage¹¹ descreveram que o osteossarcoma ocorre com mais frequência em pacientes entre 5 anos e início da idade adulta e que o aparecimento de casos novos refaz um pico em indivíduos mais idosos,

na média de 65 anos. Esta pesquisa possui resultados que concordam parcialmente com a literatura, contendo pacientes entre 10-62 anos, sendo 60% deles dentro da faixa etária de 5-20 anos, porém apenas 2 (7%) com mais de 60 anos.

Sexo

O osteossarcoma apresenta pequena predileção pelo sexo masculino. No estudo de Wang et al.⁵ a distribuição desta neoplasia primária para os sexos masculino e feminino foi de 54,1% e 45,9%, respectivamente. Este estudo apresentou frequência igual no tocante ao sexo (14 feminino e 14 masculino), resultado que não destoava com o encontrado na literatura.

Sobrevida e óbito

A sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 65-75%, segundo Becker et al.¹ Neste trabalho, foi encontrado menor tempo de sobrevida, 46,7%. O tempo com até 20 anos de idade foi nitidamente menor em comparação com os mais velhos; a população deste estudo era predominantemente jovem.

A sobrevida em 5 anos no tumor localizado é de 60-80%. Estes tumores são mais susceptíveis de serem curados se forem ressecáveis, isto é, se todo o tumor for corretamente identificado e puder ser retirado cirurgicamente. Se ele já está disseminado, no momento do diagnóstico, a

sobrevida em 5 anos despenca para 15-30%, segundo a American Cancer Society em 2019¹² este dado ajuda a entender o menor tempo de sobrevivida encontrado nesta pesquisa, tendo em conta que o Hospital Erasto Gaertner é referência estadual para o osteossarcoma e não seleciona os casos em função do tamanho do tumor, invasão tecidual ou tempo de doença.

Aqueles com doença recorrente apresentam índices sombrios de sobrevivida. Da mesma forma, características como localização em esqueleto axial do tumor, sexo masculino e idade avançada mostraram correlação com resultados inferiores Bielack et al.¹³ nesta pesquisa, 1 caso envolveu a pelve, com sobrevivida de apenas 2 meses. Os pacientes que tiveram o diagnóstico de osteossarcoma após os 60 anos sobreviveram em média 44 meses, concordando com os resultados da pesquisa supracitada. Porém, ao contrário destes autores, este estudo não demonstrou predileção mórbida para os sexos, sendo que os 12 óbitos encontrados foram igualmente distribuídos entre ambos os sexos.

Como se pode observar, houve variações de sobrevivida entre os estudos aqui citados, haja vista que foram realizados em populações com características demográficas e socioeconômicas diferentes.

Localização

Segundo Mirabello, Troisi e Savage¹¹ a metáfise dos ossos longos dos membros inferiores, especificamente o fêmur distal e a tíbia proximal (joelho), são os locais primários mais comumente envolvidos, corroborando com esta pesquisa que apresentou 75% dos casos acometendo membros inferiores, 21,4% em membros superiores e apenas 1 (3,6%) envolvendo a pelve. Em 32% dos casos deste estudo, o osteossarcoma foi encontrado na anatomia óssea que envolve o joelho. Estes autores também reportaram índice de sobrevivida maior quando o acometimento se dava em membros superiores, concordando com este estudo que obteve sobrevivida de aproximadamente 70% para os em membro superior, contra 40% no inferior.

Chen et al.¹⁴ citaram como localização mais comum a metáfise dos ossos longos, mais comumente o fêmur distal (43%), a tíbia proximal (23%) e o úmero (10%), à semelhança com o presente estudo, que demonstrou que as metáfises do úmero foram acometidas em 10,7% dos casos.

Metástases

Independentemente da quantidade de tumores em cada paciente, a metástase pulmonar foi a mais frequente. Em concordância com este trabalho o qual revelou que 93% das metástases acometem o pulmão, Posthumadeboer et al.¹⁵ relataram que este órgão está envolvido em aproximadamente 80%. Pradelli et al.¹⁶ classificaram a implantação tumoral à distância por localização, como pulmonar ou extrapulmonar, e citam que a disseminação metastática é a principal causa de morte relacionada ao osteossarcoma, mesmos resultados deste estudo que possuiu 75% dos óbitos com metástase.

A sobrevivida em 5 anos para pacientes com osteossarcoma localizado pode chegar a 80%; porém,

se ele já está disseminado no momento do diagnóstico a sobrevivida em 5 anos cai para 15-30%, segundo a American Cancer Society em 2019¹² Neste trabalho, a sobrevivida em 5 anos sem metástase foi de 70%, em contraste com pacientes que apresentaram a disseminação da doença, nestes a sobrevivida foi menor que 30%.

Metástase pulmonar é a manifestação inicial mais comum de doença disseminada, segundo Huang et al.¹⁷ estes autores também citam que mais de 90% dos pacientes com esta neoplasia morrem com acometimento pulmonar; corroborando com esta pesquisa cujos 75% dos óbitos tinham a doença metastática nos pulmões.

Progressão da doença

O prognóstico dos pacientes após recidiva local é ruim. Os com doença recorrente apresentam índices sombrios de sobrevivida¹³ Este estudo não apresentou nenhum caso de recidiva, porém 2 casos foram refratários ao tratamento e apresentaram mau prognóstico, sobrevivendo, em média, apenas 17 meses e meio a partir do diagnóstico, resultado que reforça o estudo supracitado.

Quanto aos biomarcadores

Expressão da β -catenina

A superexpressão de β -catenina pode ser usada como um dos fatores de risco para avaliar metástases pulmonares precoces e prognóstico de sobrevivida em pacientes com osteossarcoma.¹⁸

O estudo de Xue-Yuan et al.¹⁹ sugeriu que a superexpressão de β -catenina está associada ao alto risco de metástase e mau prognóstico. Estes autores selecionaram amostra com 33 casos de osteossarcoma com diferentes classificações histológicas (14 de alto grau e 19 de baixo grau) para detectar a expressão de β -catenina pelo método imunistoquímico. A expressão de β -catenina foi observada tanto no citoplasma quanto no núcleo nos de alto grau e apenas no citoplasma celular nos de baixo grau. A marcação positiva da β -catenina foi observada em 85,7% dos casos, ou seja, em 12 dos 14 tumores de alto grau. Na presente pesquisa, essa proporção foi diferente, ou seja, apenas 5 de 27 pacientes (18,5%) com alto grau positivaram para β -catenina. Entretanto, 4 deles apresentaram prognóstico reservado, evoluindo com metástase, concordando com os estudos de Nusse e Clevers¹⁸; Xue-Yuan et al.¹⁹; and Bao et al.²⁰ que também mostraram que a alta expressão de β -catenina está associada à metástase pulmonar e mau prognóstico em osteossarcoma. No presente estudo, das 5 marcações positivas para β -catenina, 80% evoluíram com metástase (3 pulmonares e 1 linfonodal) e destes, todos apresentaram a neoplasia primária em membro inferior e tinham no máximo 20 anos de idade. Por meio da curva de projeção, a sobrevivida em 5 anos dos pacientes com expressão de β -catenina é de apenas 20%, concordando com Chen et al.²¹ que indicaram que a β -catenina pode ser usada como biomarcador para o prognóstico de pacientes com tumores malignos.

Expressão do CDX2

Os alvos da via de sinalização Wnt, incluindo β -catenina, ciclina D1 e c-MYC, são regulados para mais

ou para menos nas células de câncer de cólon de acordo com a inibição ou superexpressão, respectivamente, do CDX2. A conclusão do estudo de Yu et al.²² indica que o CDX2 inibe a proliferação e a formação das células cancerígenas do cólon, suprimindo a via Wnt/ β -catenina, corroborando com este trabalho que não apresentou nenhuma marcação imunoistoquímica positiva, no total dos 28 pacientes com diagnóstico de osteossarcoma.

O CDX2 é detectado por imunoistoquímica no núcleo das células epiteliais do intestino delgado e grosso, no epitélio pancreático e em diferentes neoplasias malignas: adenocarcinoma colorretal primário ou metastático (86-100%), adenocarcinoma gástrico (22-90%), tumor carcinoide gastrointestinal (30-70%), adenocarcinoma ovariano mucinoso (11-100%), carcinoma pancreático (32-60%) e raramente no carcinoma prostático (2-6%). Park et al.²³ até o presente momento, não foram encontrados trabalhos sobre a associação deste biomarcador com o osteossarcoma. Este estudo demonstrou que não há relação dele com a expressão de CDX2; nenhum tumor teve marcação nuclear positiva para este biomarcador e a sobrevida para pacientes com marcação negativa foi de 48%, pouco acima da sobrevida geral encontrada na presente pesquisa.

A expressão aberrante do gene CDX2 está associada à inflamação intestinal e à tumorigênese. Constitui marcador com alta sensibilidade para carcinomas colorretais e excelente utilização para diferenciar metástases pulmonares de carcinomas colorretais de adenocarcinomas primários de pulmão Lugli et al.²⁴ Já segundo Bruun et al.²⁵, o CDX2 é supressor do tumor de cólon no adulto e a sua perda da expressão está associada aos estágios avançados desse câncer e com pequena diferenciação celular. Alguns estudos verificaram que a perda da expressão de CDX2 está associada a mau prognóstico.^{26,27} Conclusões contraditórias como a destes estudos também apareceram nesta pesquisa, considerando-se que não houve diferença na mortalidade dos pacientes que tiveram marcação negativa ou inconclusiva para CDX2. Utilizando a curva de Kaplan-Meier, observa-se que a sobrevida até o 3º. ano é similar para os 2 grupos marcados. Indica-se que são necessárias mais pesquisas sobre a participação da expressão do biomarcador CDX2 no processo oncogênico.

Expressão do c-MYC

O oncogene c-MYC é superexpresso na maioria das neoplasias em humanos e contribui para a causa de pelo menos 40% dos tumores Miller et al.²⁸ No osteossarcoma, a ativação do c-MYC é crítica tanto para o início quanto para a manutenção da tumorigênese e invasão tecidual. Yang, Yuzbasiyan-Gurkan e Tepe.²⁹ nesta pesquisa, metade dos casos com expressão deste biomarcador evoluiu com o desenvolvimento de metástase pulmonar.

Segundo Gamberi et al.³⁰ o c-MYC foi detectado em alta porcentagem de tumores refratários, concordando com os resultados deste trabalho que teve 50% dos casos refratários de osteossarcoma com presença de expressão nuclear deste proto-oncogene. A expressão elevada desta proteína no mesmo tumor foi fortemente correlacionada com o desenvolvimento de metástases. Seis de 7 tumores

primários apresentaram metástases quando da expressão aumentada de c-MYC associada a expressão de outro oncogene, o c-FOS.³⁰

No presente trabalho, a expressão do c-MYC no núcleo de células de osteossarcoma foi associada à mortalidade de 50% e não foi detectada em pacientes cuja faixa etária é a mais incidente para o osteossarcoma, 5-20 anos, conforme descrito por Mirabello, Troisi e Savage.¹¹

Perspectivas futuras

O papel dos marcadores biológicos de osteossarcoma ainda é incerto, pois apenas um pequeno número de marcadores foi avaliado de maneira adequada. Apresenta-se como perspectiva futura a possibilidade de detecção precoce do osteossarcoma por meio de marcadores biológicos. A grande questão para o futuro é responder a uma pergunta antiga: "Qual destas proteínas serve para auxiliar na previsão prognóstica e na ação terapêutica?" Marcadores biológicos são componentes celulares, estruturais e bioquímicos, que podem definir alterações celulares e moleculares tanto em células normais quanto naquelas associadas à transformação maligna. O processo de identificação e validação para uso clínico do marcador tem diversas etapas: identificação inicial feita em linhagens celulares do tumor em questão; teste do marcador em tecido proveniente de biópsias de pacientes com diagnóstico estabelecido do tumor; teste em biópsias de tecidos normais e com processo inflamatório; e teste que possa ser usado em população de alto risco.

Marcadores biológicos são estudados em diferentes neoplasias primárias, porém poucos tiveram seu valor clínico definido. Em trabalhos futuros, seria recomendada a realização de estudos prospectivos, randomizados e com grupo controle, com a finalidade de selecionar amostra mais homogênea e comparar amostras. Em relação à técnica utilizada, sugere-se que seja realizada a confirmação da expressão proteica pela expressão gênica, para melhor elucidação dos resultados.

CONCLUSÃO

Houve expressão imunoistoquímica das proteínas β -catenina e c-MYC e não houve essa expressão na proteína CDX2 em amostras de osteossarcoma. Não foi possível correlacionar a expressão imunoistoquímica das proteínas β -catenina, CDX2 e c-MYC nos tecidos de osteossarcoma com idade ao diagnóstico, tempo de sobrevida e metástase.

Contribuição dos autores

Conceituação: Cássio Zini

Metodologia: Carmen Austrália Paredes Marcondes Ribas

Administração do projeto: Paulo Afonso Nunes Nassif, Fernando Issamu Tabushi

Supervisão: Ana Maria Waaga-Gasser, Martin Gasser

Redação [esboço original]: Jorge Alberto Langbeck Ohana

Redação [revisão e edição]: Igor Lima Maldonado

REFERÊNCIAS

1. Becker RG, Galia CR, Morini S, Viana CR. Expressão imuno-histoquímica das proteínas VEGF e HER-2 em biópsias de osteossarcoma. *Acta Ortop Bras.* 2013;21(4):233-8. <https://doi.org/10.1590/S1413-78522013000400010>

2. Bispo-Júnior RZ, Camargo OP. Is there any difference in the prognosis for patients with primary osteosarcoma with a poor response to neoadjuvant chemotherapy between huvo grades i and ii? *Rev Bras Ortop.* 2011;46:76-80. [https://doi.org/10.1016/S2255-4971\(15\)30256-1](https://doi.org/10.1016/S2255-4971(15)30256-1)
3. Tanaka MH, Penna V, Chung WT, Lopes A. Tumores Malignos Primários dos Ossos. *Arq Cat Med.* 1997;26:18-21.
4. Ren Z, Liang S, Yang J, Han X, Shan L, Wang B. Coexpression of CXCR4 and MMP9 predicts lung metastasis and poor prognosis in resected osteosarcoma. *Tumour Biol.* 2016;37:5089-96. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4352-8>
5. Wang Z, Zhou Y, Huang X, Pan W, Liu M, Yan X, et al. Predictors of the survival of primary and secondary older osteosarcoma patients. *J Cancer.* 2019;10(19):4614-22. <https://doi.org/10.7150/jca.32627>
6. Limmahakun S, Pothacharoen P, Theera-Umpon N, Arpornchayanon O, Leerapun T, Luevitoonvechkij S, et al. Relationships between serum biomarker levels and clinical presentation of human osteosarcomas. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(7):1717-22.
7. Martin JW, Squire JA, Zielenska M. The genetics of osteosarcoma. *Sarcoma.* 2012;2012:627254. <https://doi.org/10.1155/2012/627254>
8. Kager L, Tamamyan G, Bielack S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma. *Future Oncol.* 2017;13(4):357-68. <https://doi.org/10.2217/fo-2016-0261>
9. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. C-MYC and cancer metabolism. *Clin Cancer Res.* 2013;18(20):5546-53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0977>
10. Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA, Roschke A, et al. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:228-33. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.228>
11. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004. *Cancer.* 2009;115:1531-43. <https://doi.org/10.1002/cncr.24121>
12. American Cancer Society. Survival Rates for Osteosarcoma. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/osteosarcoma/detection-diagnosis-staging/survival-rates.html>. Accessed on: 2019.
13. Bielack SS, Kempf-Bielack B, Delling G, Exner GU, Flege S, Helmke K, et al. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J Clin Oncol.* 2002;20(3):776-90. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.3.776>
14. Chen DJ, Lai Q, Zhu J, Wan Z, Liu H, Dai M, et al. Lumbar spinal canal osteosarcoma. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(25):e12120. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000011210>
15. Posthumadeboer J, Witlox MA, Kaspers GJL, Royen BJV. Molecular alterations as target for therapy in metastatic osteosarcoma: a review of literature. *Clin Exp Metastasis.* 2011;28(5):493-503. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9384-x>
16. Pradelli E, Karimjee-Soilihi B, Michiels JF, Ricci JE, Millet MA, Vandenbos F, et al. Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. *Int J Cancer.* 2009;125(11):2586-94. <https://doi.org/10.1002/ijc.24665>
17. Huang X, Zhao J, Bai J, Shen H, Zhang B, Deng L, et al. Risk and clinicopathological features of osteosarcoma metastasis to the lung: A population-based study. *J Bone Oncol.* 2019;7(16):100230. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2019.100230>
18. Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities. *Cell.* 2017;169:985-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
19. Xue-Yuan W, Cui-Pei H, Chi-Hua G, Wei MA. Expressions of ADM and β -catenin in human osteosarcoma and their clinical significance. *J X'an Jiaotong Univ.* 2016;2:268-72. Doi: Expressions of ADM and β -catenin in human osteosarcoma and their clinical significance.
20. Bao ZQ, Zhang CC, Xiao YZ, Zhou JS, Chai DM. Over-expression of Sox4 and β -catenin is associated with a less favorable prognosis of osteosarcoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2016;36:193-9.
21. Chen Z, He X, Jia M, Liu Y, Qu D, Wu D, et al. β -catenin overexpression in the nucleus predicts progress disease and unfavourable survival in colorectal cancer: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(5):e63854. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063854>
22. Yu J, Liu D, Sun X, Yang K, Yao J, Cheng C, et al. CDX2 inhibits the proliferation and tumor formation of colon cancer cells by suppressing Wnt/ β -catenin signaling via transactivation of GSK-3 and Axin2 expression. *Cell Death Dis.* 2019;10(1):26. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1263-9>
23. Park JC, Bramlage MP, Ellerson LH, Pirog EC. Immunoprofile of adenocarcinomas of the endometrium, endocervix and ovary with mucinous differentiation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009;17(1):8-11. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e318174f012>
24. Lugli A, Tzankov A, Zlobec I, Terracciano LM. Differential diagnostic and functional role of the multi-marker phenotype CDX2/CK20/CK7 in colorectal cancer stratified by mismatch repair status. *Mod Pathol.* 2008;21:1403-12. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.117>
25. Bruun J, Sveen A, Barros R, Eide PW, Eilertsen I, Kolberg M, et al. Prognostic, predictive, and pharmacogenomic assessments of CDX2 refine stratification of colorectal cancer. *Mol Oncol.* 2018;12(9):1639-55. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12347>
26. Dalerba P, Sahoo D, Clarke MF. CDX2 as a prognostic biomarker in stage II and stage III colon cancer. *N Engl J Med.* 2016;374(3):211-22. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1602584>
27. Zhang BY, Jones JC, Briggler AM, Hubbard JM, Kipp BR, Sargent DJ, et al. Lack of caudal-type homeobox transcription factor 2 expression as a prognostic biomarker in metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2017;16:124-8. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.09.003>
28. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res.* 2012;18(20):5546-53. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.09.003>
29. Yang Y, Yuzbasiyan-Gurkan V, Tepe JJ. Abstract 4729: Targeting c-MYC degradation as a novel therapeutic strategy for osteosarcoma. *Cancer Res.* 2019;79(13 Suppl):4729. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2019-4729>
30. Gamberi G, Benassi MS, Bohling T, Ragazzini P, Moledini L, Sollazzo MR, et al. C-myc and c-fos Human Osteosarcoma: Prognostic Value of mRNA and Protein Expression. *Oncology.* 1998;55(6):556-63. <https://doi.org/10.1159/000011912>