

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA P-GLICOPROTEÍNA Y DEL P53 EN OSTEOSARCOMAS HUMANOS

EDDY VERÓNICA MORA¹, JORGE LUÍS MOSQUERA¹, ALDO REIGOSA Y²

¹INSTITUTO DE ONCOLOGÍA "DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO". ²CENTRO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS Y BIOTECNOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO. VALENCIA

RESUMEN

OBJETIVO: El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la expresión de p-glicoproteína y del p53 en los osteosarcomas humanos y de esta manera establecer si su presencia tiene algún significado como factor pronóstico. Este trabajo fue realizado en el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" de Valencia, Estado Carabobo, Venezuela. **MÉTODOS:** Se incluyeron un total de 24 pacientes con osteosarcoma metastásico y no metastásico al momento de establecer el diagnóstico, fueron clasificados por: edad, sexo, localización de la lesión, tipo histológico, grado de diferenciación del tumor y sobrevida. Se les realizaron a todas las muestras reacciones de inmunohistoquímica para determinar la expresión tanto de p53, como de p-glicoproteína y así clasificarlos en una escala semicuantitativa. **RESULTADOS:** La proporción entre varones y hembras fue de 1,4:1. El promedio de edad fue de 45,9 años, encontrándose el 58,3 % entre los 15 y 25 años. La localización más frecuente fue el fémur, seguido por cabeza y cuello y fíbula. La variedad histológica que predominó fue el tipo osteoblástico seguido por el fibroblástico, y el clasificado como telangectático. El 79 % expresaron p-glicoproteína y el 87 % expresaron el p53. El análisis de múltiples variables no demostró asociación estadísticamente significativa entre las mismas. **CONCLUSIONES:** Demostramos que existe una fuerte expresión de p-glicoproteína y p53 en nuestros pacientes, pero no encontramos una asociación estadística significativa entre variables. Es necesario diseñar nuevas investigaciones para establecer el verdadero significado de estos hallazgos.

PALABRAS CLAVE: Osteosarcoma, p-glicoproteína, p53, factores pronósticos.

Recibido 14/06/2006 Revisado 02/11/2006
Aceptado para publicación 14/11/2006

SUMMARY

OBJECTIVE: The objective of this study is to evaluate the impact of the expression of p-glycoprotein and p53 in human osteosarcomas and also to identify if his presence has any significant prognostic factors. These works were realized for patients of the Institute of Oncology "Dr. Miguel Pérez Carreño" city of Valencia, Carabobo state, Venezuela. **METHODS:** A total of 24 patients with metastasis and no metastasis osteosarcomas were included at the time of diagnostic the patients were classified by the age, sex, site of the lesion histological group, differentiation grade, and survival. We examined all the cases with immunohistochemistry to determine the expression of p-glycoprotein and p53, and in these form classifiable them in a semiquantitative way. **RESULTS:** The male and female ratio was 1, 4:1. The mean age was 45, 9 years, but 58, 3 % were between 15 and 25 years old. The most common localization site was the femur, followed by head neck and the fibula. The histological variable in most of the cases were osteoblastic, followed by type the fibroblastic and the classified how telangectatic. The 79 % express positive to p-glycoprotein and 87 % express positives to p53. The multivariate analysis didn't showed associations statistics significance between the variables. **CONCLUSION:** We demonstrated a strong expression of p-glycoprotein and p53 in our patients but we do not find a statistic significance association between the variables. New designs are necessary to settle the really meaning of the findings.

KEY WORDS: Osteosarcoma, p-glycoprotein, p53, prognostic factors.

Correspondencia: Dra. Eddy Verónica Mora.
Av. Navas Spínola entre Campo Elías y Ricaurte
Nº 90-51. Urb. San Blas. Valencia Estado Carabobo.
E-mail: veronicam@cantv.net.

INTRODUCCIÓN

Los osteosarcomas, son tumores malignos primarios de los huesos, que tienen un comportamiento altamente agresivo y afectan principalmente a niños y adultos jóvenes⁽¹⁻³⁾. Antes de la década de los 70 su tratamiento consistía en la amputación y la mortalidad era mayor del 70 %^(1,4). Con el descubrimiento de múltiples agentes antineoplásicos, se han utilizado drogas efectivas en combatir esta neoplasia, lográndose una supervivencia libre de enfermedad entre 45 % y 90 %, que en conjunto con el empleo de cirugía menos mutilante, destinada a preservar la funcionalidad del miembro (Limb Salvage), empleada como alternativa a la amputación, mejorando significativamente el pronóstico de estos pacientes⁽¹⁻⁷⁾.

En líneas generales, una vez que se realiza el diagnóstico, el tratamiento consiste en quimioterapia preoperatoria, seguido de una cirugía definitiva y quimioterapia posoperatoria.

Se han estudiado gran cantidad de características tanto clínicas, biológicas y bioquímicas como posibles factores de tipo pronóstico, sin embargo, el grado de necrosis posquimioterapia, establecido en el espécimen quirúrgico que resulta de la cirugía definitiva, es el factor pronóstico más aceptado^(1,7-13).

De esta manera, surge la necesidad de encontrar elementos pronósticos capaces de ser identificados en la biopsia inicial, que nos permitan establecer cuales pacientes serán buenos respondedores al tratamiento con quimioterapia y así, diseñar nuevos esquemas específicos según el tipo de paciente^(6,14).

Entre estos factores se han descrito desde la edad y el sexo, tamaño del tumor, la presencia o ausencia de metástasis al momento del diagnóstico, las variedades histológicas, el grado de diferenciación, la necrosis tumoral como respuesta a la quimioterapia, la ploidía de las

células tumorales, presencia de p-53, MDR, PGP, c-erb-2, la capacidad de las células de osteosarcoma de unirse a la adriamicina y la resistencia a múltiples drogas^(1,4-6, 8,10,11,15).

Probablemente, la resistencia a la quimioterapia, constituya el principal problema en el tratamiento del cáncer en general. Esta resistencia puede afectar a una sola droga citotóxica, o puede desarrollarse resistencia a un amplio espectro de agentes diferentes utilizados en el tratamiento del cáncer⁽¹⁰⁾. Esto se denomina MDR, las siglas en inglés de resistencia a múltiples drogas (*multidrug resistance*). Gran cantidad de estudios clínicos *in vitro*, han demostrado que uno de los principales responsables de este fenómeno, es un incremento en la expresión de p-glicoproteína⁽⁸⁻²¹⁾.

La p-glicoproteína (PGD) es una proteína de alto peso molecular (170 a 190 kDa), que se encuentra en la membrana citoplasmática y funciona como una bomba de efusión de drogas, dependiente de energía⁽²⁰⁾.

Altos niveles de PGP expresan normalmente en células epiteliales de la corteza adrenal, canalículos biliares hepáticos, túbulo proximal renal, intestino y barrera hemato-encefálica, postulándose que participa en el transporte fisiológico, actuando como una bomba para metabolitos potencialmente tóxicos y sustancias extrañas.

Recientes investigaciones han demostrado, que una sobreexpresión de PGP, en varios tipos de tumores malignos y especialmente en osteosarcomas y sarcoma de Ewing, es capaz de actuar como una bomba de membrana, extrayendo de la célula, agentes antineoplásicos tales como, doxorubicina, vincristina y actinomicina D, etc. Más aún, se ha encontrado una correlación negativa entre la respuesta histológica al tratamiento con doxorubicina preoperatoria y la positividad o nivel de expresión de p-glicoproteína por las células tumorales. De esta manera, esta sobreexpresión podría ser responsable no sólo de lo refractario

al tratamiento quimioterápico, sino también a la progresión de la enfermedad^(8,13). Así la identificación de la expresión de PGP, específicamente en osteosarcomas, antes del inicio del tratamiento, podría ser utilizado como un factor, capaz de predecir el riesgo de progresión de la enfermedad y desarrollo de resistencia al tratamiento⁽⁸⁾.

Por otra parte el P-53, gen supresor de crecimiento tumoral, es determinado con alteraciones en forma muy frecuente en muchos de los tumores humanos. De hecho uno de los primeros tumores en los cuales se estudió fue en osteosarcomas. La pérdida de los alelos en el cromosoma 17, particularmente en la región 17 p-53, se encontró en más del 75 % de los osteosarcomas, lo cual sugiere la contribución del gen de supresión tumoral p-53 localizado en esta región en el desarrollo de esta neoplasia, sin embargo, la significación pronóstica del p-53 mutado permanece sin establecer^(4,5,11).

MÉTODOS

Realizamos un estudio descriptivo-correlacional de carácter retrospectivo, con un enfoque deductivo, cuantitativo, utilizando un diseño no experimental, de tipo transeccional, con múltiples variables a analizar.

Se examinaron un total de 24 pacientes con el diagnóstico de osteosarcoma, ingresados al Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño", los cuales cumplieron con los criterios de inclusión de la investigación como son disponibilidad de los bloques de parafina y de las historias clínicas.

Se reevaluaron las láminas histológicas coloreadas con hematoxilina y eosina, realizando nuevos cortes histológicos en los casos que lo ameritara, a partir de los bloques de parafina, de material procesado en Autotecnicon®, de la manera habitual.

Se realizaron análisis mediante el método de

estreptavidina-biotina-peroxidasa, utilizando anticuerpos monoclonales, que reconozca diferentes epitopes de PGP y p53. Como anticuerpo secundario se utilizó una anti IgG policlonal antiratón, anticonejo y anticabra, unida a una biotina y como puente el complejo estreptavidina peroxidasa. Los cortes de 5 micras de tejido fijado en formol, descalcificado con ácido nítrico al 6 % e incluido en parafina se colocó en un baño de flotación, para luego ser recogidos con una lámina portaobjeto previamente impregnada con poli L-lisina, fueron llevados a la estufa por 15 minutos, desparafinados con xilol (tres lavados de 5 minutos cada uno), y deshidratados con alcohol a concentraciones decrecientes (tres lavados en alcoholes de concentraciones 100°, 95° y 70° durante 5 minutos cada uno). La actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida con peróxido de hidrógeno al 3 % durante un minuto. La muestra se incubó con solución recuperadora de antígenos para tejido de buffer-citrato a pH 6, se lavó con buffer PBS a pH 7,4, tres veces. Posteriormente fue incubada con el anticuerpo primario (anti p-glicoproteína/p53) durante 7 a 10 minutos. Se lavó con buffer PBS a pH 7,4, tres veces. Se incubó con el anticuerpo secundario anti i.e. policlonal durante 7 a 10 minutos. Se lavó con buffer PBS a pH 7,4, tres veces. Se incubó con estreptavidina-peroxidasa durante 7 a 10 minutos. Se lavó con buffer PBS a pH 7,4, tres veces. Se reveló con 3'3' diaminobencidina (DAB). Se lavó con buffer PBS a pH 7,4, tres veces. Se contratiñó con hematoxilina de Harris durante 15 minutos. Posteriormente se lavó con agua corriente y se pasó nuevamente por alcohol a concentraciones crecientes (tres lavados con alcoholes de concentraciones 70°, 95° y 100° durante 5 minutos cada uno). Se realizaron tres lavados en xilol (durante 5 minutos cada uno) y se colocaron las muestras en un medio montante o en resina sintética (DPX o Martex). Se utilizaron cortes de riñón como controles positivos (túbulo contorneado proximal) y negativos (glomérulo)

y caos con más de 80 % de positividad para p53, así como controles negativos en los cuales el anticuerpo primario fue omitido.

El resultado de la inmunotinción para p-glicoproteína, los casos positivos fueron aquellos que mostraron una coloración marrón dorada de la membrana citoplasmática y/o área de Golgi y para el p-53 la tinción fue nuclear.

La positividad será medida, en el área de máxima reactividad, en una escala semi-cuantitativa donde 0 correspondió a ninguna tinción, 1+ correspondió de 1 % a 25 % de células positivas, 2+ correspondió de 26 % a 50 % de células positivas, 3+ correspondió de 51 % a 75 % de células positivas y 4 + correspondió de 76 % a 100 % de células positivas.

El análisis de los datos se realizó utilizando las llamadas tendencias centrales (promedio) y medidas de dispersión (desviación *standard*). La asociación entre variables se estableció utilizando coeficientes de correlación y coeficientes de regresión, utilizando el paquete estadístico SPSS12®.

RESULTADOS

De un total de 24 pacientes con el diagnóstico de osteosarcoma, evaluados en este estudio, el 58,3 % fueron del sexo masculino y el 41,6 % fueron del sexo femenino, con una relación entre varón y hembra de 1,4:1. El promedio de edad fue de 22 años, observándose una desviación estándar de 12,6 (Cuadro 1). La mayoría de los pacientes se encontraron por encima de los 15 años, un poco mayor a lo reportado en otras series nacionales. Con respecto a la localización, 10 pacientes presentaron tumores localizados en el fémur (41 %), sin embargo, la segunda localización más frecuente en nuestra institución fueron las neoplasias en la cabeza y el cuello (21 %), seguido por otros huesos largos (fíbula y húmero). Con respecto al estudio histopatológico, la mayoría de los osteosarcomas

Cuadro 1. Osteosarcoma. Características generales.

Características clínico-patológicas de los pacientes

Nº de pacientes	24
Promedio de edad (Rango 9-65 años)	45,9
DS	
Masculino-femenino	14:10
Grado de diferenciación	
I	9
II	7
III	8
Sobrevida global	Meses
0-72	24,4
Centrales	9,9
Periféricos	63
Cabeza y cuello	25,75

Archivos de IOMPC 2004.

correspondieron a las variedades convencionales, el osteoblástico (37 %) y el fibroblástico (25 %), seguido de los osteosarcomas telangectásico y condroblástico, (17 % cada uno). El 33 % de los pacientes presentaban enfermedad metastásica al momento del diagnóstico, de estos 75 % presentaron metástasis pulmonares y 25 % metástasis en sistema nervioso central. Los pacientes presentaron un promedio de sobrevida global de 24,4 meses, sin embargo, si discriminamos estos entre los pacientes según la localización topográfica de los osteosarcomas, aquellos con osteosarcomas centrales presentaron una sobrevida global de 9 meses, con osteosarcomas en cabeza y cuello, 23 meses y con osteosarcomas periféricos de 63 meses. Al realizar los estudios inmunohistoquímicos observamos la expresión de PGP en 79 % de los casos y en 80 % de los centrales y de p53 en 87 % de los casos y en 86 % de los osteosarcomas centrales.

Se realizó un análisis de múltiple variables para determinar la asociación estadística entre las variables en estudio, sin encontrarse valor

estadístico significativo entre ninguna de las mismas, la edad/PGP ($P=0,7$), supervivencia/PGP ($P=0,9$), edad/grado de diferenciación ($P=0,3$), edad/supervivencia ($P=0,9$), grado de

diferenciación/PGP ($P=0,7$), la edad/p53 ($P=0,7$), supervivencia/p53 ($P=0,9$) grado de diferenciación/p53 ($P=0,3$).



Figura 1. Aspecto radiológico de osteosarcoma de fíbula, en el cual se evidencia la presencia de minúsculo triángulo de Codman.



Figura 2 Aspecto clínico y macroscópico con adolescente con osteosarcoma osteoblástico de fémur derecho.

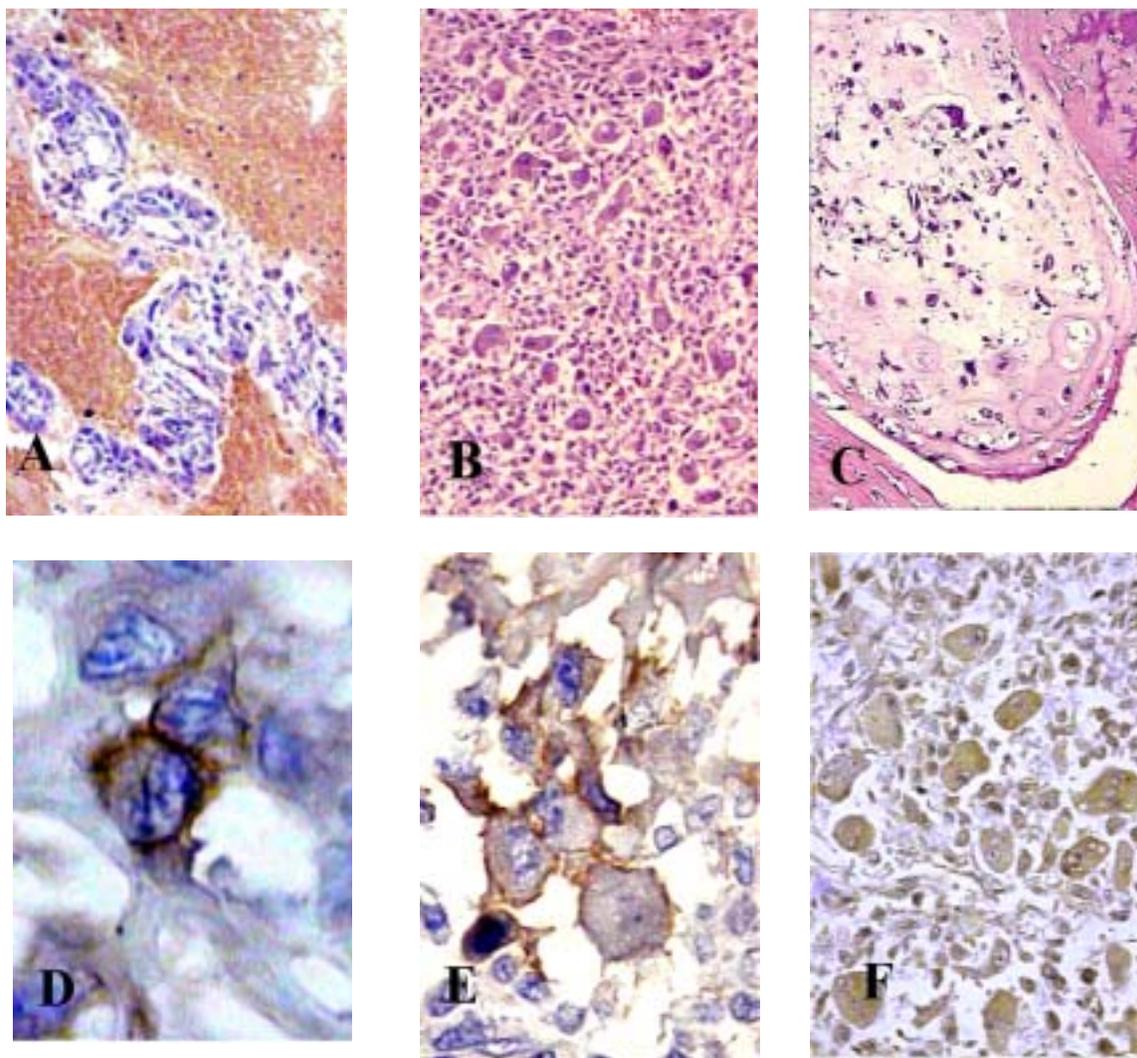


Figura 3.

- A: Osteosarcoma telangiectásico (He 20x)
 B: Osteosarcoma con componente de células gigantes (He-20x)
 C: Osteosarcoma condroblástico (He 20x)
 D: PGP expresión de membrana vitoplasmática (100x)
 E: PGP inmunomarcaje superficial y citoplasmático (40x)
 F: PGP positividad en el área de Golgi (20x)

DISCUSIÓN

En este análisis encontramos algunos datos coincidentes y discordantes con la literatura nacional y mundial. Si bien algunas carac-

terísticas clínicas tales como la distribución por sexo y la relación entre el sexo masculino y femenino coinciden con lo descrito previamente,

el promedio de edad de presentación, así como la distribución por grupos es un poco mayor a lo descrito en series anteriores^(1-3,15,20-27). En nuestra investigación el 58,3 % de los pacientes se encuentran entre los 15 y 25 años, esto podría explicarse, por las características de nuestro diseño; en los trabajos citados, se excluyen a los pacientes mayores de 40 años y los pacientes con tumores del macizo cráneo-facial. Inclusive, en nuestra data se observa como segundo lugar más importante de presentación las lesiones de cabeza y cuello, las mismas, en conjunto con los osteosarcomas periféricos, es bien sabido que poseen características clínico-patológicas distintivas de los osteosarcomas de los huesos largos de tipo central.

Con respecto a la variedad histológica, es llamativa la alta frecuencia de osteosarcomas de tipo telangectásico, el mismo se incluye entre las variedades no convencionales de osteosarcomas y en algunos estudios lo implican con un curso clínico más agresivo⁽¹⁻⁴⁾.

La mayoría de nuestros pacientes presentan una sobrevida global de 24 meses significativamente menor a las series anteriores nacionales, sin embargo, la diversidad en los esquemas de tratamiento y el seguimiento bastante irregular de nuestros pacientes, nos impidió diseñar una investigación en la cual pudiéramos comparar estas variables, incluyendo la respuesta a la quimioterapia en el espécimen quirúrgico⁽²⁰⁻²⁷⁾.

Es bien conocido que la mayoría de los pacientes con osteosarcomas clásicos (menores de 40 años, con tumores localizados en las extremidades y sin evidencia de metástasis al momento del diagnóstico) son exitosamente tratados con esquemas de quimioterapia y cirugía preservadora. Sin embargo el 30 % a 40 % de estos pacientes presentarán recaídas. De esta manera muchas de las investigaciones actuales están enfocadas en identificar factores capaces de ser predictivos del curso clínico en pacientes en el momento del diagnóstico. Es así donde

muchas sustancias se han asociado con el desarrollo de resistencia a la quimioterapia, metástasis y recaídas, entre estos marcadores tenemos a la PGP.

Los estudios inmunohistoquímicos demostraron en esta revisión una frecuencia de expresión de PGP y de p53 mucho mayor a lo descrito en otras series, a pesar de que no fue posible demostrar una relación estadísticamente significativa entre la expresión de PGP, p53 y las variables clínico patológicas en estudio.

Vale la pena comentar con respecto a la PGP, observamos una fuerte positividad expresada tanto en la superficie epitelial, como en el citoplasma y el área Golgi. Hoy día, en algunos estudios se ha descubierto la redistribución subcelular de la PGP y diferentes sustancias responsables del desarrollo de la resistencia a algunas drogas quimioterápicas, tales como la doxorubicina, encontrándose no sólo en la membrana citoplasmática, como también en el núcleo. Esto se asocia con la extracción hacia el espacio extracelular de diferentes drogas⁽²⁷⁾.

En investigaciones en las cuales se compara la determinación de PGP, a través de método inmunohistoquímico y PCR, se ha encontrado que este último método es capaz de identificar células de osteosarcomas que resultaron negativas para PGP, por lo que se impone en nuestro caso la comparación con otros métodos más sensibles⁽²⁷⁾.

En algunas investigaciones de tumores malignos como el adenocarcinoma de mama, colorrectal y tumores de vejiga, el p53 se ha asociado con una respuesta peor a la quimioterapia y curso clínico más agresivo. Esto nunca se ha demostrado en los osteosarcomas⁽⁸⁾.

Debemos recordar que no todas las mutaciones del mismo son identificadas mediante inmunohistoquímica sin embargo, en esta investigación su expresión fue significativamente mayor a lo descrito en la literatura mundial. De la misma manera nosotros tampoco

encontramos relación estadísticamente significativa entre la expresión del p53 y las otras variables en estudio.

En conclusión en nuestro análisis no nos fue posible la identificación de factores pronósticos independientes. Sin embargo se impone el

desarrollo de un diseño que incluya una serie de mayor tamaño, que nos permita comparar otras variables y establecer de esta manera el verdadero significado de la expresión de estos marcadores, como son el PGP y el p53.

REFERENCIAS

- Pitcher J, Gebhardt M, Springfield D, Rosenberg A, Mankin H. Osteosarcoma: The Massachusetts General Hospital-Boston Children's Hospital 20-year Experience in *Frontiers of Osteosarcoma Research. Interdisciplinary Survey of Clinical and Research Advances*. En: Novak J, McMaster J, editores. Hogrefe and Hubert Publishers, Seattle, Toronto, Göttingen, Bern. 1993.p.17-23.
- Lichtenstein L. Classification of primary tumors of bone. *Cancer*. 1951;4:335-341.
- Campanacci M. Bone and soft tissue tumors. Wien, Springer, 1999:463-491.
- Jaffe N. Osteosarcoma: Contribution of the chemotherapy to treatment of the primary bone tumor. En: Novak J, McMaster J, editores. *Frontiers of Osteosarcoma Research. Interdisciplinary Survey of Clinical and Research Advances*. Hogrefe and Hubert Publishers, Seattle, Toronto, Göttingen, Bern. 1993.p.5-6.
- Wunder J, Bell R, Wold L, Andrulis I. Expression of the Multidrug Resistance Gene and Clinical Outcome in Osteosarcoma. En: Novak J, McMaster J, editores. *Frontiers of Osteosarcoma Research. Interdisciplinary Survey of Clinical and Research Advances*. Hogrefe and Hubert Publishers, Seattle, Toronto, Göttingen, Bern. 1993.p.3-4.
- Bruland O, S Pihl, A. On the current management of osteosarcoma. A Critical Evaluation and a Proposal for a Modified Treatment Strategy. *Euro J Cancer*. 1997;33:1725-1731.
- Serra M, Scotlandi K, Reverter-Branchat G, Ferrari S, Manara M. Value of p-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcomas extremities. *J Clin Oncol*. 2003;21:536-542.
- Mealey K, Barhoumi R, Rogers K, Kochevar D. Doxorubicina Induced Expression of p-glycoprotein in Canine Osteosarcoma Cell Line. *Cancer Letters*. 1998;126:187-192.
- Kreicbergs A, Silfverswärd C, Tribukait B. Flow DNA Analysis of Primary Bone Tumours. Relationship between Cellular DNA Content and Histopathological Classification. *Cancer*. 1984;53:129-136.
- Scotlandi K, Perdichizzi S, Manara M, Serra M, Benini S, Cerisano V, et al. Effectiveness of the Ecteinascidina-743 against Drug-sensitive and Resistant Bone Tumors Cells. *Clin Cancer Res*. 2002;8:3893-4003.
- Manara M, Serra M, Benini S, Picci P, Scotlandi K. Effectiveness of type I interferons in the treatment of multidrug resistant osteosarcomas cells. *Int J Oncol*. 2004;24:365-372.
- Kusuzaki K, Hirata M, Takeshita H, Murata H, Hashiguti S, Ashihara T, et al. Relationship between P-glycoprotein positivity, doxorubicin binding ability and histologic response to chemotherapy in osteosarcomas. *Cancer Letters*. 1999;138:203-208.
- Benjamin RS. Soft tissue sarcomas: Biological diversity, staging and need for multidisciplinary therapy. *AJCC*. 2003.p.447-452.
- Petrilli S, Camargo B, Odone V, Bruniera P, Brunetto A. Results of the brazilian osteosarcoma treatment group studies III and IV: Prognostic factors and impact on survival. *J Clin Oncol*. 2006;24:1161-1168.
- Mealey K, Barhoumi R, Rogers K, Kochevar D. Doxorubicina induced expression of p-glycoprotein in canine osteosarcoma cell line. *Cancer Letters*. 1998;126:187-192.
- Scotlandi K, Bertoni M, Hattinger C, Benini S, Perdichizzi S. Prognostic and therapeutic relevance of her2 expression in osteosarcomas and Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer*. 2005;41:1349-1361.
- Takeshita H, Kusuzaki K, Ashihara T, Gebhardt M, Mankin H, Hirasawa Y. Actin Organization Associated with the Expression of Multidrug resistant Phenotype in Osteosarcoma Cells and effect of actin depolymerization on drug resistance. *Cancer Letters*. 1998;126:75-81.

18. Biedler June. Genetic Aspects of multidrug Resistance. *Cancer*. 1992;70:1799-1809.
19. Lee J, Hughes C, Fine R, Page R. P-glycoprotein Expression in Canine Lymphoma. A relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer*. 1996; 77: 1982-1988.
20. Nass I, Urdaneta A, Rodriguez L, Nóbrega A, Cruz A. Tumores óseos malignos. Análisis de nuestra casuística (1969-1987). *Rev Venez Oncol*. 1991;(3):130-134.
21. Pereira A, Santos S, Mota F. Tumores sólidos en niños y adolescentes: registro hospitalario de cáncer (1985-2001). *Rev Venez Oncol*. 2003;15(3):161-169.
22. Paredes R, Herrera L, Pinto S, López B, Figuera J, Vargas G. Osteosarcoma del macizo craneofacial. Experiencia en el Instituto de Oncología "Luis Razetti". Caracas. *Rev Venez Oncol*. 1993;5(3):111-118.
23. Martínez M, Camacho J, Herrera L, Parra J, Aguilera A, Ramírez N, et al. Evaluación de altas dosis de methotrexate (t-10 Rosen) en pacientes menores de 16 años con diagnóstico de osteosarcoma. *Rev Venez Oncol*. 1993;5(2):86-92.
24. Martínez M, Camacho J, Herrera L, Gascue A, Moschella F, Pereira A, et al. Osteosarcoma en niños. Evaluación clínico-radiológica y de anatomía patológica. *Rev Venez Oncol*. 1993;5(2):80-85.
25. Martínez M, Aguilera A, Jiménez C, Panebianco C, Colaiacovos S, Pérez Alonso F, et al. Osteosarcoma en niños y adolescentes. Reporte definitivo del brazo pediátrico del grupo cooperativo venezolano para el estudio de los tumores óseos. (GCVETO). *Rev Venez Oncol*. 2000;12(4):143-167.
26. Maraldi N, Santi S, Scotlandi K, Serra M, Baldini N. P-glycoprotein subcellular localization and cell morphotype in MDR1 gene-transfected human osteosarcomacells. *Biol Cell*. 1999;91:17-28.
27. Kandel R, Campbell S, Noble-Tophan S, Bell R, Andrullis I. *Diagn Mol Pathol*. 1995;4:59-65.