



FRANCISCO FONTES CINTRA

**ANÁLISE DE FATORES ANGIOGÊNICOS E DA EXPRESSÃO
DA COX-2 EM TUMORES DE LINHAGEM CARTILAGINOSA -
Correlação Clínico-Histológica**

**CAMPINAS
2012**



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Ciências Médicas

FRANCISCO FONTES CINTRA

**ANÁLISE DE FATORES ANGIOGÊNICOS E DA EXPRESSÃO DA
COX-2 EM TUMORES DE LINHAGEM CARTILAGINOSA-
Correlação Clínico-Histológica**

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Etchebehere

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção de título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração Anatomia Patológica

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno **FRANCISCO FONTES CINTRA** e orientada pela **Profa. Dra. ELIANE MARIA INGRID AMSTALDEN**

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C493a Cintra, Francisco Fontes, 1980-
Análise de fatores angiogênicos e da expressão da
COX-2 em tumores de linhagem cartilaginosa :
correlação clínico-histológica / Francisco Fontes Cintra. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Eliane Maria Ingrid Amstalden.
Coorientador : Mauricio Etchebehere.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neovascularização. 2. Patologia. 3. Prognóstico.
4. Condroma. 5. Condrossarcoma. I. Amstalden, Eliane
Maria Ingrid, 1957-. II. Etchebehere, Maurício, 1967-. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Analysis of angiogenic factors and the expression of COX-2 in tumors of cartilaginous lineage : clinical-histological correlation.

Palavras-chave em inglês:

Neovascularization

Pathology

Prognosis

Chondroma

Chondrosarcoma

Área de concentração: Anatomia Patológica

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Eliane Maria Ingrid Amstalden [Orientador]

Maria Aparecida Barone Teixeira

Claudia Regina Gomes Cardim Mendes de Oliveira

Patrícia Sabino de Matos

Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade

Data da defesa: 10-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Francisco Fontes Cintra

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Eliane Maria Ingrid Amstalden

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Maurício Etchebehere

Membros:

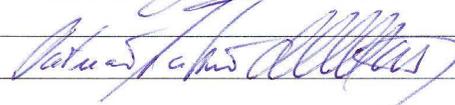
Professor (a) Doutor (a) Maria Aparecida Barone Teixeira



Professor (a) Doutor (a) Cláudia Regina Gomes Cardim Mendes de Oliveira



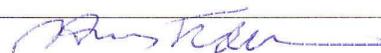
Professor (a) Doutor (a) Patricia Sabino de Matos



Professor (a) Doutor (a) Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade



Professor (a) Doutor (a) Eliane Maria Ingrid Amstalden



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10/12/2012

Trabalho realizado no Laboratório de Pós Graduação do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

Ao meu Senhor Jesus Cristo
que me capacitou e sustentou
durante a minha vida.

À minha esposa Mirelle,
pelo amor, paciência e compreensão.

Aos queridos Laércio e Zélia,
fiéis despenseiros da multiforme graça de Deus.

Aos meus pais, Ronaldo e Maria Letícia
pelo incentivo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden, pela confiança depositada em mim, oferecendo-me a oportunidade de realizar este trabalho e pela disposição e paciência em me ensinar e orientar.

Ao Prof. Dr. Maurício Etchebehere, pela disposição e incentivo à carreira acadêmica e pela pessoa altruísta que é.

À bióloga Ana Cláudia Piazza, pela incessante ajuda e orientações na técnica de imuno-histoquímica.

À técnica Luzia Reis pelo cuidado na confecção das lâminas e paciência nos inúmeros recortes adicionais.

Ao técnico de imagem Adilson Abílio Piazza, pelas sugestões e auxílio competente na obtenção e correção de toda a documentação da Tese e do trabalho científico.

Às secretárias Maria do Carmo Machado da Silva e Elizabeth Justi Rodrigues, pela infinita ajuda em todas as fases desta jornada, inclusive alertando-me e instruindo-me quanto aos prazos e documentação.

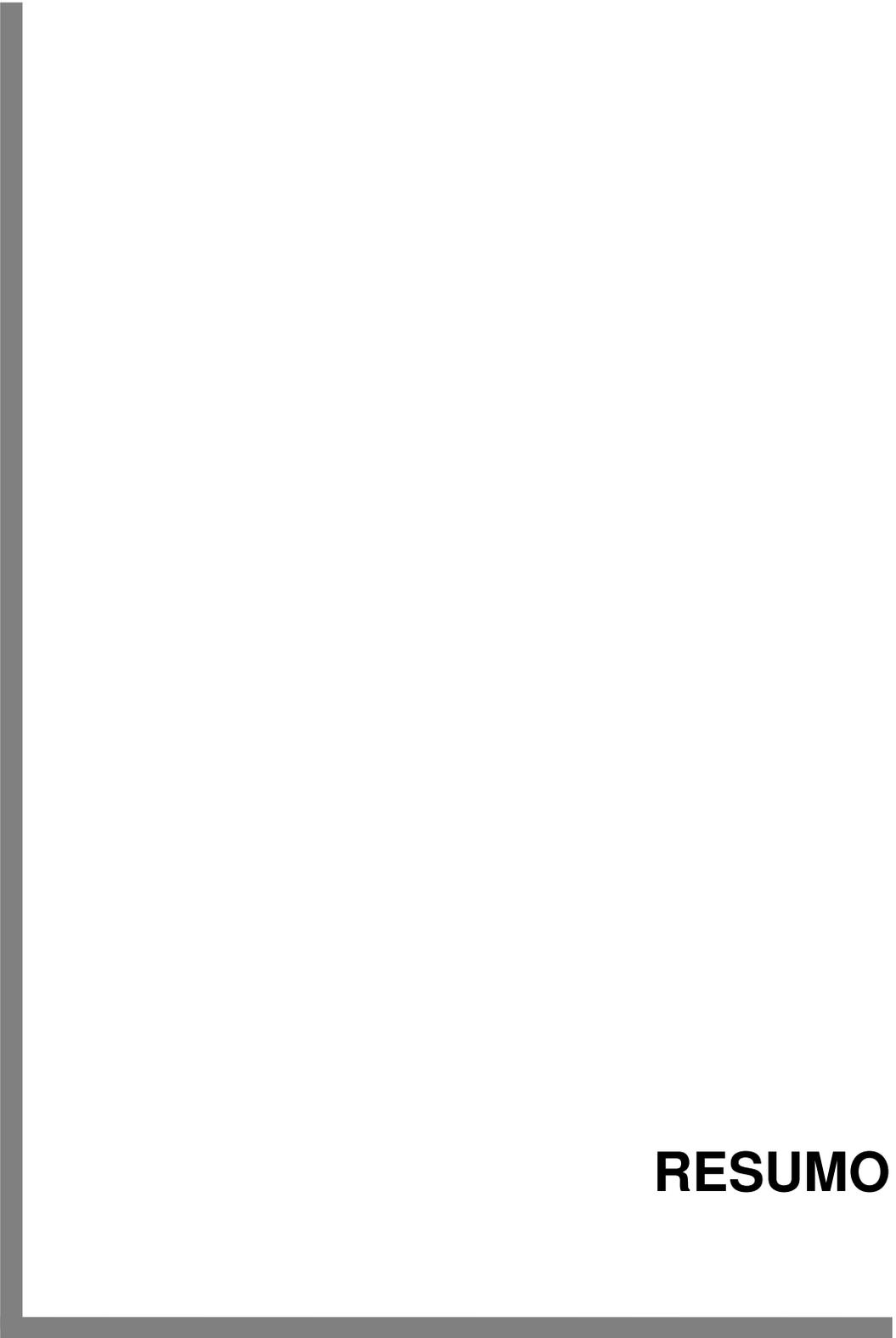
À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão financeira que viabilizou a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica - FCM/Unicamp, pela ajuda e paciência.

Aos colegas de Pós-graduação, pela amizade e ajuda.

*“Feliz o homem que acha sabedoria e o homem que adquire conhecimento,
porque melhor o lucro que ela dá do que a prata e
melhor a sua renda do que o ouro mais fino.”*

Provérbios de Salomão 3:13-14

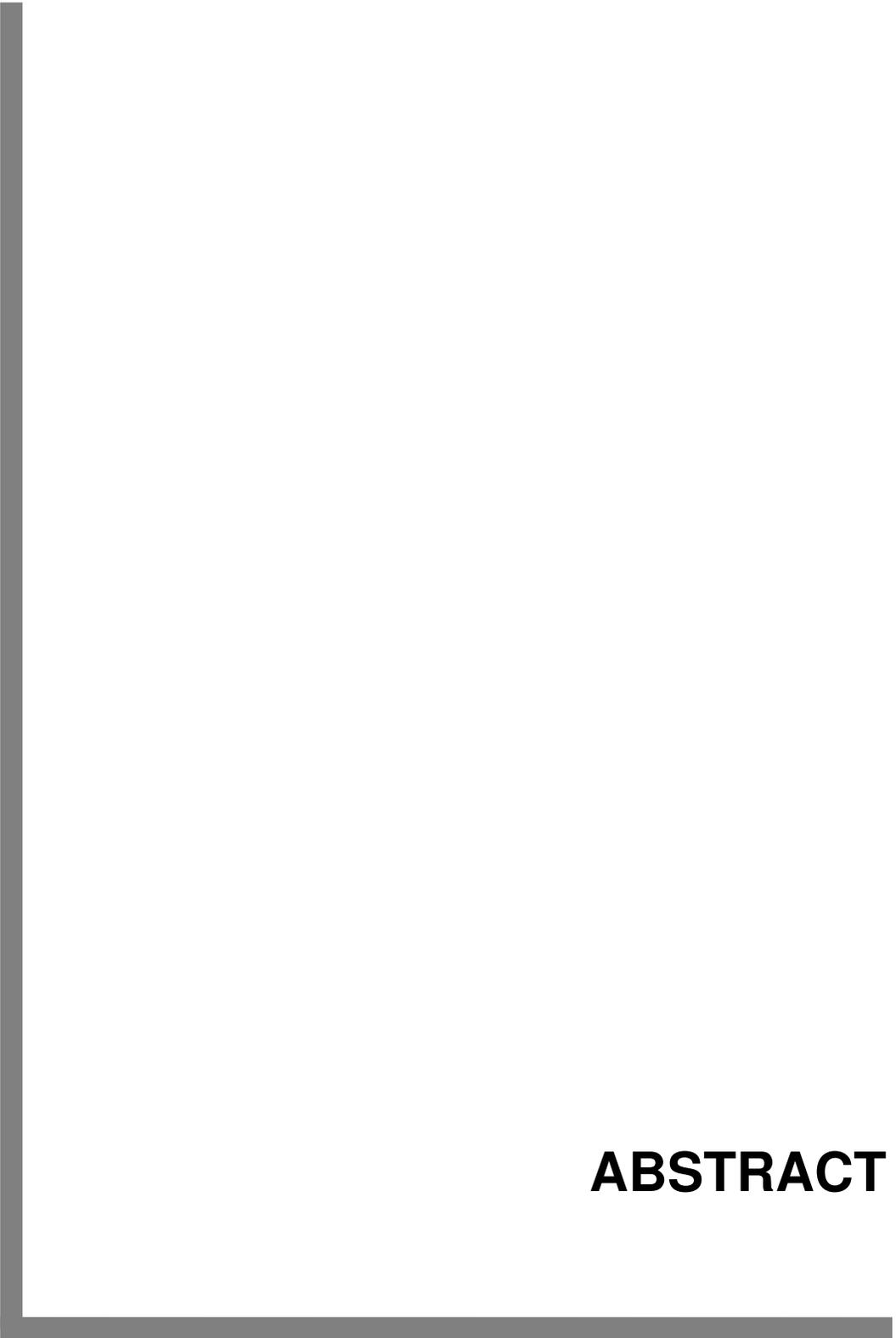


RESUMO

Introdução: Os condrossarcomas são tumores cartilagosos com manifestações clínicas e morfológicas diversas. A identificação do comportamento biológico em processos neoplásicos é essencial para definir a conduta terapêutica e a estimativa prognóstica. Distinguir condrossarcoma de baixo grau de encondroma é difícil. A angiogênese tem sido relacionada à taxa de crescimento tumoral e prognóstico, e a expressão de marcadores, como a COX-2, com o comportamento biológico. A análise da angiogênese induzida pelo tumor e da imuno-expressão da COX-2 poderia auxiliar na determinação do prognóstico do paciente, bem como na distinção entre encondroma e condrossarcoma de baixo grau. **Objetivos:** estudar o valor da angiogênese, do uso de marcadores de estimativa de índole biológica maligna e padrão arquitetural dos vasos (padrão vascular), por meio da técnica de imuno-histoquímica, no diagnóstico diferencial do encondroma e condrossarcoma de baixo grau, assim como na estimativa do prognóstico dos pacientes com estes tumores. **Métodos:** 21 encondromas e 58 condrossarcomas convencionais foram selecionados para este estudo, sendo separados em 3 grupos: **I-** 21 encondromas; **II-** 31 condrossarcomas grau 1; **III-** 27 condrossarcomas graus 2 e 3. Os espécimes foram estudados quanto às suas características histopatológicas, marcadores de angiogênese (VEGF, CD34 e CD105) e expressão da COX-2. As informações clínicas foram resgatadas dos prontuários. Os tumores foram avaliados de forma cega e simultânea, por dois observadores, para a escolha de cinco áreas com a maior concentração de células/vasos imuno-marcados (“*hot-spots*”), definidas em consenso, em aumento de X400. A estimativa da expressão do VEGF e da COX-2 foi mensurada por meio da contagem das células positivas e negativas nas áreas de maior expressão (“*hot spots*”) e determinada a proporção média. A vascularização foi aferida com o marcador CD34, utilizando-se do método de Chalkley. A análise da neoangiogênese foi medida por meio do anticorpo anti-CD105. A avaliação do padrão vascular dos tumores foi feita segundo o método de Kalinski. Os resultados foram tabulados e tratados por métodos estatísticos. **Resultados:** Foi encontrada associação entre evolução desfavorável e as seguintes variáveis: **1-** condrossarcomas de moderado e alto graus; **2-** localização em ossos chatos; **3-** alta densidade microvascular; **4-** padrão

arquitetural caracterizado por diminuição do tamanho dos lóbulos com aumento de vasos na sua periferia (subtipo B de Kalinski) ou franca vascularização intra-lobular (subtipo C de Kalinski). Também foi observada associação entre o aumento da angiogênese e condrossarcomas de ossos chatos. Houve correlação entre aumento da densidade microvascular e hiperexpressão da COX-2. A hiperexpressão do VEGF relacionou-se com os padrões vasculares Kalinski B e C. As variáveis analisadas não permitiram diferenciar condrossarcoma de baixo grau de encondroma. Não foi encontrada associação entre o prognóstico e idade, sexo, ou expressão da COX-2, CD105 e VEGF. **Conclusão:** A avaliação da densidade microvascular e do padrão vascular podem ser uma ferramenta prognóstica adicional no manejo de pacientes com condrossarcoma. A densidade microvascular maior em condrossarcomas de ossos chatos pode estar associada à evolução desfavorável, nesta localização. Nenhuma das variáveis estudadas mostrou-se útil para diferenciar os condrossarcomas de baixo grau dos encondromas.

Apoio: FAPESP-09/51473-0



ABSTRACT

Background: Chondrosarcomas are a heterogeneous group of cartilaginous tumors with varied clinical and morphological features. Like any other cancer, the distinction between benign and malignant nature, in cartilaginous bone tumors, is essential for the determination of treatment modality and prognosis evaluation. The distinction between enchondroma and grade 1 chondrosarcoma is very difficult. Angiogenesis has been associated with tumor growth and prognosis, and the expression of COX-2, with the biological nature. Analysis of tumor-induced angiogenesis and immuno-expression of COX-2 could possibly assist in determining patient prognosis as well as distinguish between enchondroma and low grade chondrosarcoma. **Objectives:** To study the value of immunohistochemical markers of angiogenesis, biological malignancy in the differential diagnosis of cartilaginous tumors and architectural vascular pattern, as well as in estimating prognosis of patients. **Methods:** 21 enchondromas and 58 conventional chondrosarcomas were chosen and classified in three groups: **I-** enchondromas (n=21); **II-** low grade chondrosarcomas (n=31); **III-** moderate and high grade chondrosarcomas (n=27). All specimens were evaluated for their clinical findings, histopathological markers of angiogenesis (VEGF, CD34 and CD105) and expression of COX-2. The clinical data were retrieved from the medical records. Tumors were evaluated, blindly and simultaneously, by two observers for the analysis of the immunohistochemical preparations. VEGF and COX-2 immunostaining evaluation was determined by the proportion of positive cells in five "hot spots", defined by consensus, in X400 magnification. For CD34 and CD105, five areas were chosen with the highest concentration of micro-vessels ("hot spots"), through the use of the Chalkley graticule for counting. We further evaluated the vascular pattern of the tumor according to Kalinski. The results were tabulated for statistical analysis. **Results:** Fourteen patients had poor evolution (recurrence, metastasis and death). There were no significant differences regarding the follow-up time between groups. The following factors were statistically associated with poor prognosis: **1-** chondrossarcomas of intermediate and high grades; **2-** localization in flat bones; **3-** increased micro-vascular density (over-expression of CD34); **4-** tumor architectural pattern

characterized by decrease of the size of the lobules with increased vascularization in their periphery (Kalinski vascular pattern B) and marked intra-lobular vascularization (Kalinski vascular pattern C). A positive association was found between increased angiogenesis and flat bones chondrosarcomas. COX-2 expression was high in tumors with high microvascular density. VEGF over-expression correlated with Kalinski B/C vascular patterns. None of the variables proved to be useful to differentiate low-grade chondrosarcoma from enchondroma. No statistical correlation was found between the prognosis and the following variables: age, gender, and expression of COX-2, CD105 and VEGF.

Conclusion: Evaluation of microvessel density and vascular pattern can be useful as additional prognostic tools in the management of patients with chondrosarcoma. Higher microvessel density in chondrosarcomas of flat bones may be associated with unfavorable outcome in this location. None of the variables studied in this work proved useful to differentiate low-grade chondrosarcomas from enchondromas.

Support: FAPESP-09/51473-0

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|--|
| COX | Enzima cicloxigenase |
| CD34 | Epítopo de superfície CD34 |
| CD34-DMV | Densidade microvascular aferida por meio do anticorpo anti- CD34 |
| CD105 | Epítopo de superfície CD105 (Endogлина) |
| CS | Condrossarcoma |
| Dx | Diagnóstico |
| Enc | Encondroma |
| F | Feminino |
| M | Masculino |
| DMV | Densidade microvascular |
| VEGF | Fator de crescimento do endotélio vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) |

| | Pág. |
|---|-------------|
| Tabela 1 Tumores cartilagosos: achados clínicos e imuno-histoquímicos..... | 92 |
| Tabela 2 Condrossarcomas (n=58): correlação entre a evolução e os achados clínicos, histológicos e imuno-histoquímicos (excluídos os encondromas)..... | 94 |
| Tabela 3 Tumores cartilagosos: correlação entre evolução e grupos..... | 95 |
| Tabela 4 Condrossarcomas: correlação entre evolução e localização das lesões..... | 95 |
| Tabela 5a Tumores cartilagosos: correlação entre a densidade microvascular e a evolução..... | 96 |
| Tabela 5b Condrossarcomas (excluídos os encondromas): correlação entre a densidade microvascular e a evolução..... | 96 |
| Tabela 6 Condrossarcomas: análise multivariada da densidade microvascular pelo CD34 e a localização tumoral..... | 97 |
| Tabela 7 Condrossarcomas: análise multivariada comparativa da expressão da COX-2 com a do VEGF e a densidade microvascular aferida por meio do CD34..... | 97 |
| Tabela 8 Tumores cartilagosos: análise comparativa entre o padrão vascular e a densidade microvascular (DMV), ambas por meio do CD34..... | 98 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Tabela 9 | Tumores cartilagosos: análise comparativa entre o padrão vascular (por meio do CD34) e as variáveis VEGF, COX-2 e localização tumoral..... | 99 |
| Tabela 10 | Tumores cartilagosos: análise comparativa entre o padrão vascular e os subtipos histológicos..... | 100 |
| Tabela 11 | Tumores cartilagosos: análise comparativa entre encondroma e condrossarcoma de baixo grau..... | 100 |

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1 Exemplos de imagens radiográficas dos tumores cartilaginosos: A- encondroma da falange proximal da mão; B- condrossarcoma grau 1 do fêmur; C- condrossarcoma grau 2 da tíbia; D- condrossarcoma grau 3 da tíbia..... | 44 |
| Figura 2 Esquema ilustrativo dos diferentes padrões de vascularização das neoplasias (Hillen et al., 2007)..... | 57 |
| Figura 3 Neoplasias cartilaginosas: diagnóstico e graduação segundo a classificação dos tumores ósseos da Organização Mundial de Saúde (2002). A- encondroma; B- condrossarcoma grau 1; C- condrossarcoma grau 2 e D- condrossarcoma grau 3.... | 66 |
| Figura 4 Distribuição topográfica dos tumores cartilaginosos na amostra..... | 69 |
| Figura 5 Encondroma: “ <i>hot spots</i> ” de células neoplásicas imunomarcadas para a COX-2..... | 73 |
| Figura 6 Condrossarcomas grau 1 A- e grau 2; B- células imunomarcadas para o VEGF: A- baixa expressão; B- alta expressão..... | 74 |
| Figura 7 Expressão do VEGF nos diferentes tumores cartilaginosos: A- encondroma; B- condrossarcoma grau 1; C- condrossarcoma grau 2; D- condrossarcoma grau 3..... | 75 |
| Figura 8 Encondroma, expressão do CD34: gráticula de Chalkley empregada para a determinação da densidade microvascular..... | 77 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 9 | Densidade microvascular (DMV) em tumores cartilagosos imuno-marcados pelo CD34: A- encondroma (baixa DMV); B- condrossarcoma grau 2 do íliaco (alta DMV)..... | 78 |
| Figura 10 | Padrão vascular nos condrossarcomas imuno-marcados pelo anticorpo anti-CD34: A- condrossarcoma grau 1 (padrão A); B- condrossarcoma grau 2 (padrão B); C- Condrosarcoma grau 3 (padrão C)..... | 80 |
| Figura 11 | Condrossarcomas imuno-marcados pelo anti-CD105: A- condrossarcoma grau 1 - vasos penetrando o lóbulo tumoral (aumento original x400); B- condrossarcoma grau 2 - vasos presentes na periferia do lóbulo neoplásico..... | 81 |
| Figura 12 | Tumores cartilagosos imuno-marcados pelo anticorpo anti-COX-2: A- ausência de expressão; B- expressão em menos de 10% das células neoplásicas; C- expressão entre 10 e 50% das células neoplásicas; D- expressão em mais de 50% das células neoplásicas..... | 83 |
| Figura 13 | Expressão da COX-2 nos diferentes tumores: A- encondroma; B- condrossarcoma grau 1; C- condrossarcoma grau 2; D- condrossarcoma grau 3..... | 84 |
| Figura 14 | Condrossarcoma grau 3: expressão do anticorpo anti-CD34, predominantemente na membrana das células neoplásicas que se alinham formando fendas (mimetismo vascular)..... | 101 |

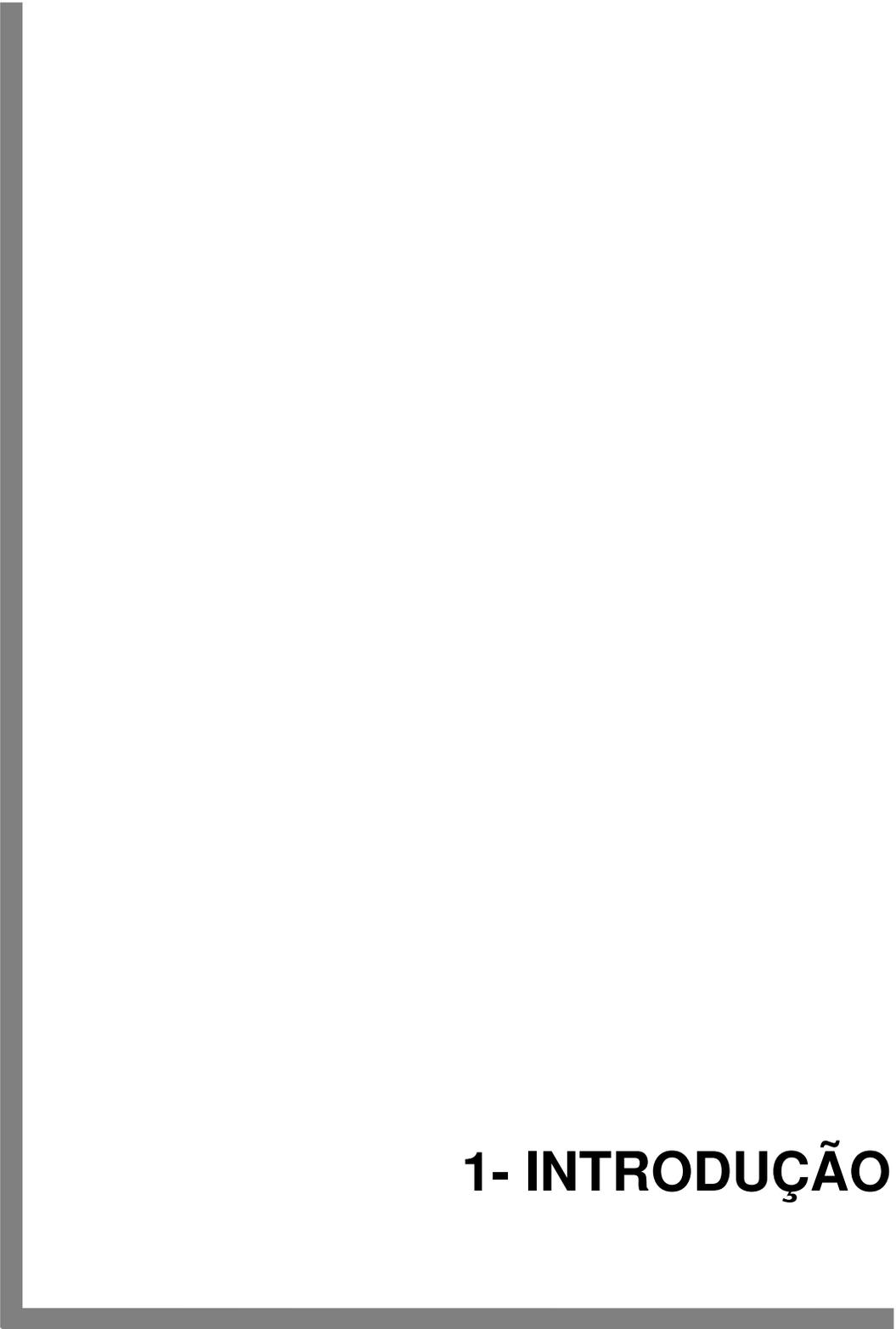
LISTA DE QUADROS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Quadro 1 Condrossarcoma: critérios para a graduação histológica (OMS, 2002)..... | 45 |
| Quadro 2 Anticorpos, clones, diluições utilizadas e fornecedores..... | 71 |

| | Pág. |
|--|-------------|
| RESUMO | xv |
| ABSTRACT | xix |
| 1- INTRODUÇÃO | 41 |
| 1.1- Generalidades | 43 |
| 1.2- Vascularização no tecido cartilaginoso | 45 |
| 1.3- Diagnóstico dos tumores cartilaginosos | 47 |
| 1.4- O emprego da técnica de imuno-histoquímica | 49 |
| 1.5- Fatores angiogênicos | 49 |
| 1.5.1- Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)..... | 49 |
| 1.6- CD34 | 51 |
| 1.7- Endogлина (CD105) | 52 |
| 1.8- A densidade microvascular | 53 |
| 1.9- Cicloxigenase-2 (COX-2) | 53 |
| 1.10- Padrões de formação de vasos/irrigação sanguínea nos tecidos tumorais | 55 |
| 1.11- Justificativa | 57 |

| | |
|--|-----------|
| 2- OBJETIVOS..... | 59 |
| 2.1- Geral..... | 61 |
| 2.2- Específicos..... | 61 |
| 3- MATERIAL E MÉTODOS..... | 63 |
| 3.1- Avaliação clínica e histológica..... | 65 |
| 3.2- Avaliação imuno-histoquímica..... | 70 |
| 3.2.1- “ <i>Hot spots</i> ”..... | 72 |
| 3.2.2- VEGF..... | 74 |
| 3.2.3- Densidade microvascular por meio do CD34..... | 76 |
| 3.2.4- Padrão vascular por meio do CD34..... | 79 |
| 3.2.5- CD105..... | 81 |
| 3.2.6- COX-2..... | 82 |
| 3.3- Análise estatística..... | 85 |
| 4- RESULTADOS..... | 87 |
| 4.1- Dados clínicos..... | 89 |
| 4.2- VEG..... | 89 |
| 4.3- Densidade microvascular aferida pelo CD34..... | 89 |
| 4.4- Padrão vascular aferido pelo CD34..... | 90 |
| 4.5- CD105..... | 90 |

| | |
|---|------------|
| 4.6- COX-2..... | 91 |
| 4.7- Correlação entre os dados..... | 93 |
| 5- DISCUSSÃO..... | 103 |
| 6- CONCLUSÕES..... | 111 |
| 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 115 |
| 8- ANEXO..... | 127 |
| 8.1- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp..... | 129 |
| 9- APÊNDICE..... | 131 |
| 9.1- Artigo publicado com parte dos resultados da tese..... | 133 |



1- INTRODUÇÃO

1.1- Generalidades

Tumores ósseos primários são relativamente incomuns e, destes, os de linhagem cartilaginosa ocupam o 3º lugar (1,2). O tumor benigno mais frequente é o osteocondroma, que é considerado um hamartoma (2). Dentre as neoplasias benignas propriamente ditas, destaca-se o condroma (quando dentro da medular óssea é chamado de encondroma), que ocupa o segundo lugar, em incidência. Pode ocorrer como lesão solitária ou múltipla (encondromatose múltipla ou doença de Ollier). Esta neoplasia pode originar-se em qualquer osso, mas é mais comum nos ossos curtos das extremidades. A imagem radiográfica é de lesão lítica medular que provoca adelgaçamento ou expansão da cortical, bem como de áreas deprimidas ou esclerose marginal. Focos de calcificação são frequentes (1,2) (Figura 1).

Com relação às neoplasias cartilagosas malignas, os condrossarcomas correspondem ao segundo tumor mais frequente dentre os sarcomas ósseos (1,2). A localização mais comum é a porção proximal dos ossos longos, na região medular. Em geral, ocorrem em indivíduos acima dos 50 anos de idade, exceto para os tumores craniofaciais. As lesões são, geralmente, primárias, mas podem ocorrer como malignização de osteocondroma ou encondroma, especialmente nas suas formas múltiplas. A imagem radiográfica é a de uma lesão lítica, destrutiva, com radiopacidade variável, pela calcificação, tipicamente pontilhada, curvilínea ou anelar (1,2) (Figura 1).

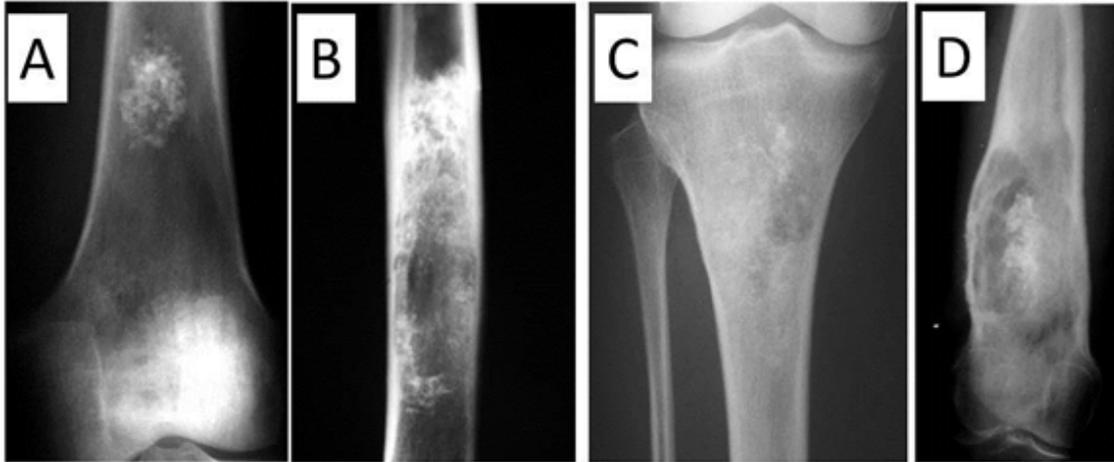


Figura 1- Exemplos de imagens radiográficas dos tumores cartilagosos: **A-** encondroma do fêmur; **B-** condrossarcoma grau 1 do fêmur; **C-** condrossarcoma grau 2 da tíbia; **D-** condrossarcoma grau 3 do fêmur.

Quanto aos achados histopatológicos, os encondromas são tumores bem delimitados, envoltos por esclerose marginal e constituídos por massas de condrócitos ocupando lacunas e mergulhados em matriz basófila. Podem ser vistas áreas mixóides, com células estreladas, bem como focos de calcificação e ossificação. Eventualmente, a densidade celular pode ser maior e alguns núcleos serem atípicos ou em número de dois (especialmente nos de extremidade). A transformação maligna é rara na forma solitária, mas ocorre em cerca de 30 a 50% dos pacientes, na forma múltipla (1,2). Quanto ao condrossarcoma, o tipo histológico convencional exibe arquitetura lobulada, sendo composto de condrócitos com graus variáveis de atipia nuclear e caráter infiltrativo, sem esclerose óssea marginal (1-3). A classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS ou *World Health Organization - WHO*) (Quadro 1) de 2002, baseada na graduação histológica, tem sido aceita como padrão para estimativa de prognóstico destes tumores (3,4).

Quadro 1- Condrossarcoma: critérios para a graduação histológica (OMS, 2002)

| Grau | Diferenciação | Densidade Celular | Hipercromatismo, Atipia e Aumento do Volume Nuclear | Bi-ou Multinucleação | Calcificação |
|------|----------------------------|-------------------|---|----------------------|--------------|
| I | Bem Diferenciado | + | + | Rara | +++ |
| II | Moderadamente Diferenciado | ++ | ++ | Moderada | ++ |
| III | Pouco Diferenciado | +++ | +++ | Frequente | + |

Os tumores bem diferenciados apresentam metabolismo baixo, têm crescimento lento e raramente geram metástases. Já os de alto grau geram metástases hematogênicas, especialmente para os pulmões, com taxa de sobrevivência de cinco anos de 45%, sendo frequente a recidiva local após a ressecção cirúrgica (2-8). O diagnóstico diferencial mais importante é o osteossarcoma condroblástico, que se distingue do condrossarcoma por formar osso ou matriz osteóide neoplásica. A forma mixóide do condrossarcoma deve ser diferenciada do cordoma, carcinomas mucossecretores metastáticos e hemangiendotelioma epitelióide. Além do condrossarcoma convencional, há variantes mais raras (também chamadas de não convencionais), como o condrossarcoma de células claras, o mesenquimatoso e o desdiferenciado (4).

1.2- Vascularização no tecido cartilaginoso

O tecido cartilaginoso normal é avascular, sendo formado por condrócitos e matriz extracelular. Os vasos estão presentes em tecidos como o pericôndrio (quando se trata da cartilagem fibrosa e elástica) e ósseo (junto à cartilagem hialina articular) (9,10). A matriz extracelular condróide apresenta moléculas com funções anti-angiogênicas, o que explica a falta de vasos neste tecido. Foram descritas, até o momento, a condromodulina, a troponina-1 e a trombospondina-1, porém sabe-se que há outras (11).

A presença de vasos, no interior do tecido cartilaginoso, está associada com atrofia/degeneração tecidual (9-11) e tem natureza fisiológica ou patológica. Como natureza fisiológica, cita-se a placa de crescimento, em que os vasos induzem a apoptose das células cartilaginosas, na fase hipertrófica, para que ocorra a ossificação. Já na osteoartrose, exemplo de natureza patológica, os vasos neoformados induzem a degeneração da matriz extracelular, por oxidação dos proteoglicanos. A terapia medicamentosa, nestes casos, previne a progressão da degeneração articular (9-11).

Nos tumores cartilagosos, especialmente nos de baixo grau, esta regra se aplica, já que estes tumores, habitualmente, não apresentam vasos no interior dos lóbulos neoplásicos (10,11). Encontram-se, apenas, agrupamentos ou lóbulos de tecido cartilaginoso neoplásico, envoltos por septos de tecido conjuntivo, os quais contêm vasos. Já nos condrossarcomas convencionais de moderado a alto grau, observam-se vasos nos septos que penetram na periferia dos lóbulos (11). A exceção a esta regra está nos condrossarcomas não convencionais (como o mesenquimatoso e o desdiferenciado), que apresentam pouca matriz extracelular e abundante quantidade de vasos da microcirculação (11). Os fatores relacionados com o aumento da formação de vasos nesses tumores são a hipóxia e a síntese de IL-1 β e VEGF-A. Tumores cartilagosos que sintetizam menos matriz extracelular (como os condrossarcomas de alto-grau e não convencionais) apresentam aumento da densidade microvascular, provavelmente por menor inibição molecular (a inibição é secundária à síntese de condromodulina, troponina-1 e trombospondina-1). Segundo Kalinski et al., são descritos três tipos de vascularização em tumores cartilagosos (11):

- a-** Pequenos vasos presentes apenas nos septos de tecido conjuntivo (encondromas e condrossarcomas convencionais de baixo grau);
- b-** Pequenos vasos presentes nos septos conjuntivos, mas também no interior dos lóbulos cartilagosos neoplásicos (condrossarcomas de graus moderado e alto);

c- Numerosos pequenos vasos intratumorais (condrossarcomas não convencionais: desdiferenciado e mesenquimatoso).

1.3- Diagnóstico dos tumores cartilagosos

O diagnóstico de um dado tumor ósseo depende do conjunto de achados em três esferas, todas elas de igual importância: a clínica, a imagem (obtida por radiografias, ressonância magnética e tomografia computadorizada) e a apresentação anatomopatológica. Contudo, muitas vezes, há discrepâncias entre os achados de imagem e os histológicos (7,8).

Distinguir o encondroma do condrossarcoma de baixo grau requer estreita cooperação interdisciplinar, para evitar tratamento inadequado (7,12).

Tumores cartilagosos são frequentemente encontrados em radiografias solicitadas durante a avaliação de um paciente com dor no sistema músculo esquelético de natureza indefinida. Além dos sintomas álgicos, pode ocorrer fratura patológica como primeira manifestação. O encondroma é, muitas vezes, assintomático, podendo ser encontrado, incidentalmente, em exames de imagem solicitados por outras causas (12).

Há seis características, observadas por meio da imagem radiográfica, que sugerem índole maligna em um tumor cartilaginoso: **1-** presença de massa em partes moles adjacentes ao osso; **2-** reação periosteal; **3-** rotura da cortical justa-articular; **4-** espessamento da cortical; **5-** tamanho do tumor acima de 4cm; **6-** aumento da massa tumoral em exames seriados (13-15) (Figura 1). A ultrassonografia é o método mais rápido e efetivo para a obtenção de biópsias orientadas (16).

Os resultados de um trabalho recente mostraram que, na ressonância nuclear magnética, a presença de ilhas de cartilagem com baixo sinal, cercadas por áreas de alto sinal (tecido gorduroso) em T1, e pelas mesmas ilhas com alto

sinal, rodeadas por áreas com baixo sinal (tecido gorduroso) em T2, na periferia da massa tumoral principal, correspondia a encondroma (sensibilidade de 70%) (17).

Com relação ao diagnóstico diferencial histológico entre os diversos tipos de tumores cartilagineos, o condrossarcoma apresenta as seguintes características morfológicas: massas de cartilagem hialina ou mixóide substituindo partes moles circunjacentes, trabéculas do osso acometido envoltas por cartilagem e reabsorção das trabéculas do osso afetado. A análise comparativa entre o encondroma e o condrossarcoma de baixo grau, quanto à densidade celular, frequência de binucleação, aumento de volume e hipercromatismo nucleares, mostra que elas podem ser semelhantes. Além disso, o caráter invasor, que define a lesão como maligna pode ser sutil ou de difícil caracterização, especialmente em material obtido por biopsia ou curetagem (2,4-7,12,13).

A distinção entre índole benigna e maligna em neoplasias cartilagineas ósseas é essencial para a escolha da melhor modalidade terapêutica e estimativa de prognóstico. Contudo, é baixa a taxa de reprodutibilidade diagnóstica inter-observador nos graus histológicos, bem como na distinção entre lesão benigna e maligna de baixo grau, nos exames histológicos convencionais. Dada a complexidade dos parâmetros dos estudos comparativos entre os vários serviços (achados clínicos, taxas de sobrevida e recidiva local), os resultados são conflitantes e, portanto, têm de ser apreciados com reserva. A despeito disto, há nítida correlação entre a taxa de recidiva e o maior grau histológico (2,5,6). No seguimento clínico acompanhado por técnicas de imagem, o condrossarcoma de baixo grau pode apresentar crescimento agressivo, mesmo quando os achados histológicos são indistinguíveis do encondroma (7). Estes resultados explicam, pelo menos em parte, a ampla variação na resposta terapêutica obtida nas diferentes instituições. Portanto, é necessário que novas estratégias de diagnóstico e graduação destes tumores sejam desenvolvidas (13).

1.4- O emprego da técnica de imunoistoquímica

Para aumentar a precisão diagnóstica, diversos autores estudaram os espécimes, com o auxílio da técnica de imunoistoquímica. Grifone e cols. observaram que grande parte dos condrossarcomas de baixo grau e dos encondromas expressa receptor estrogênico, mas a mesma se perde nos condrossarcomas de alto grau (9). Adicionalmente, os condrossarcomas de alto grau, comparativamente com os de baixo grau, expressam, à análise imunoistoquímica, fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFs). Sua maior taxa de expressão correlaciona-se com menor sobrevida (18).

1.5- Fatores angiogênicos

Angiogênese é definida como neoformação vascular secundária a estímulos por fatores de crescimento específicos (3,19). É essencial para o crescimento tecidual nos processos proliferativos celulares fisiológicos e patológicos, associando-se, nas neoplasias, a metástases à distância (11-20).

A angiogênese é um passo fundamental na transformação neoplásica e regulação do crescimento tumoral, como já demonstrado (19-20). A neovascularização é apenas um dos muitos elementos que atuam durante o processo de transformação neoplásica, bem como na progressão de tumores para graus histológicos mais altos. No entanto, como a inibição da angiogênese é importante para a preservação da cartilagem (como é proposto na abordagem terapêutica da osteoartrose) (9,21), é possível que desempenhe um importante papel na patogênese e progressão dos tumores de linhagem cartilaginosa.

1.5.1- Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

A interação entre fatores de crescimento pro-angiogênicos (como o fator de crescimento endotelial vascular - VEGF), fatores inibitórios e as características da matriz extracelular, define o fenótipo angiogênico de um tumor

(19). O VEGF é um regulador-chave da angiogênese, em processos fisiológicos e patológicos (23-25). Suas funções são: induzir a proliferação de células endoteliais (estimulando a angiogênese) e aumentar a permeabilidade vascular (24). Esta família de fatores de crescimento angiogênico e linfangiogênico inclui seis glicoproteínas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e fatores de crescimento placentário (subtipos 1 e 2). Destas, a VEGF-A (comumente chamada, apenas, de VEGF) é um polipeptídeo de 45-Kd, sintetizado e secretado por uma variedade de células normais e tumorais, sendo o mais importante e ativo destes fatores (20).

Em geral, os tumores cartilagosos apresentam pequena taxa de proliferação celular tumoral e vascular (principalmente os de baixo grau), o que explica a resistência a drogas anti-neoplásicas e a raridade de metástases à distância. Porém, a neoangiogênese é de grande importância para o crescimento tumoral e recidiva. Kalinski e cols. estudaram a expressão do VEGF-A, em tumores cartilagosos, empregando RT-PCR, *western blot* e imunohistoquímica. Eles encontraram maior expressão nos condrossarcomas graus II e III, relativamente aos desdiferenciados (26). Ayala e cols. estudaram a densidade microvascular, em espécimes histológicos de neoplasias ósseas cartilagosas, com o uso do fator VIII. Os vasos foram divididos em dois grupos: peri-cartilagosos (presentes no envoltório fibroso não cartilaginoso) e intracartilagosos (em direta aposição às células neoplásicas ou estroma tumoral). Foi observada correlação positiva entre os graus histológicos mais altos do condrossarcoma e o aumento do número de vasos peri-tumorais. Portanto, estes devem ter a função mais importante para dar suporte ao crescimento neoplásico. Por outro lado, os vasos intratumorais só eram vistos nos condrossarcomas de moderado e alto grau. Nestes, os condrócitos neoplásicos se coravam fortemente pelo VEGF, que é considerado um potente fator angiogênico. Apenas os condrossarcomas de moderado e alto grau, com vasos intracartilagosos, expressavam o VEGF. Já os encondromas e condrossarcomas de baixo grau, não expressavam o VEGF. Desta forma, é possível que os vasos intracartilagosos estejam vinculados à aquisição de capacidade de gerar

metástase (24). Falcone e cols. estudaram 21 tumores cartilagosos benignos e malignos, por técnicas imunoistoquímicas, e observaram correlação positiva entre o grau histológico e a expressão do VEGF. Também os marcadores Ki67, TGF beta, PDGF e p53 associaram-se a recidiva local (27).

Como em outros tumores, o condrossarcoma pode induzir neovascularização, à medida que cresce. Foi demonstrado que o HIF- 1 alfa, um fator produzido em condições de hipóxia, é responsável pela regulação de genes que promovem neo-vascularização, como o que produz o VEGF. É possível que estes fatores possam ter papel na progressão do condrossarcoma e, portanto, podem ser o alvo de estratégia terapêutica antiangiogênica neste tipo de tumor (28-30).

1.6- CD34

O CD34 é uma proteína transmembranosa encontrada em células endoteliais, especialmente nas células em atividade angiogênica (31), sendo expressa em vasos, tanto de tecido normal quanto tumoral. Pode ser evidenciado em outras células mesenquimatosas (32).

Todos os sete anticorpos monoclonais anti-CD34, que reconhecem epítomos de uma glicoproteína de 1110Kd das células tronco-hematopoéticas, também se ligam ao endotélio vascular. Os capilares de todos os tecidos são CD34-positivos, e os estudos mostram que a ligação do anticorpo anti-CD34 ao endotélio se faz por um produto do gene CD34 e não representa uma reação cruzada de epítomos. As moléculas CD34 estão concentradas nos processos da membrana celular e podem atuar como moléculas de adesão a leucócitos, (31,33) durante a inflamação.

1.7- Endogлина (CD105)

Um novo marcador de neoangiogênese, o CD105 ou endogлина, é uma glicoproteína de membrana expressa em células endoteliais humanas em proliferação e regulada por hipóxia (34,35). Isto a torna um importante identificador seletivo de vasos neoformados, não sendo expressa em vasos pré-existentes ou com sinais de maturação (detectados pela presença de periquitos), mesmo que tenham sido induzidos pelo tumor (11,36,37). Assim, a questão sobre qual a proporção da rede vascular do tumor é devida a vasos normais pré-existentes ou a vasos neoformados, que realmente representam a angiogênese tumoral, estaria resolvida (38). Logo, tem sido sugerido que os marcadores preferencialmente expressos em vasos neoformados, como o CD105, seriam mais apropriados para quantificar a angiogênese (39,40). Neste contexto, em trabalhos recentes, a densidade microvascular, aferida com o uso do CD105, foi mais indicativa de angiogênese tumoral (37,41). Paralelamente, Li e cols. (42) relataram um aumento no nível de CD105, em amostra de plasma de pacientes com câncer de mama, quando comparado com um grupo controle, sugerindo que este marcador também pode ser utilizado para identificar pacientes com alto risco de metástases e recidivas.

Sabe-se que a expressão dos marcadores de células endoteliais, nas neoplasias e nos tecidos normais, é heterogênea. Marcadores pan-endoteliais tradicionalmente empregados, como o CD31 e o CD34, podem não ser demonstrados, nos vasos neoplásicos, na mesma intensidade, e, de maneira geral, são preferencialmente observados nos vasos maiores e maduros (mas não nas grandes veias). (38).

Vários trabalhos publicados vêm mostrando a presença do CD105 em tumores de diversas linhagens (40-45). Em tumores de linhagem epitelial como os carcinomas de mama, colo-retal e próstata há clara correlação entre a hiperexpressão do CD105 (na avaliação tecidual por imunistoquímica e sorológica) e o aumento das taxas de metástases, invasão tumoral e menor

sobrevida (43-45). As publicações em sarcomas são mais escassas, porém estes também expressam este marcador. As leucemias de linhagem mielóide apresentam hiper-expressão tecidual e sorológica do CD105, no entanto não está claro, ainda, se a expressão deste marcador se relaciona com o prognóstico (45).

1.8- A densidade microvascular

Weidner e colaboradores observaram, em 1990, que os resultados da aferição da densidade microvascular, em regiões de alta concentração de vasos (chamadas de “*hot spots*”), apresentavam correlação com o prognóstico, em carcinomas de mama e próstata. Estes resultados também se associavam ao estágio da doença (recidiva, metástases e sobrevida) e com a resposta ao tratamento empregado (40, 41,42).

Desde então, diversos trabalhos corroboraram esses resultados, inclusive em tumores de diferentes linhagens (como o melanoma e tumores dos sistemas respiratório e gastrointestinal). Vários marcadores de endotélio foram identificados como ferramenta para aumentar a acurácia diagnóstica e prognóstica (CD34, CD31, Fator de Von Willebrand, D2-40 e CD105) (40-42,45-48).

1.9- Cicloxigenase-2 (COX-2)

As cicloxigenases (COXs) são proteínas integrais, ou seja, que se encaixam entre as duas camadas lipídicas da membrana plasmática. As células dos mamíferos contêm duas isoformas únicas relacionadas às enzimas cicloxigenases: a COX-1 e a COX-2. Ambas participam da biossíntese de prostanoídes (incluindo prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos), fisiologicamente muito importantes, pois catalisam o ácido aracídico, por ocasião dos processos inflamatórios (49,50). A COX-1 foi a primeira a ser identificada. Sua expressão nas células é constante, principalmente em condições fisiológicas,

e é considerada uma proteína expressa por um “*housekeeping gene*” (gene constitucionalmente expresso na maior parte das células, que codifica proteínas necessárias às funções elementares, básicas, das células, ou seja, para a sua sobrevivência) (49).

Por outro lado, a COX-2 é uma enzima induzível, que é expressa, caracteristicamente, por células que atuam, diretamente, no processo inflamatório, como os macrófagos, e está associada a estados patológicos, incluindo o câncer. Essa enzima é altamente regulada e transitoriamente induzida, em uma grande variedade de linhagens celulares, por diversos estímulos, como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), citocinas, fator de necrose tumoral (TNF), formas intermediárias reativas de oxigênio e radiação ultravioleta (49,50). Mutações nas proteínas que interagem, especificamente, com certos elementos do mRNA do gene COX-2, podem causar perda de regulação pós-transcricional, resultando na hiperexpressão da enzima (50).

Existem crescentes evidências de que a COX-2 é observada e hiperexpressa em lesões melanocíticas metastáticas, atuando numa fase crítica do desenvolvimento e progressão destes tumores, na sua fase intra-epitelial (51). Em vários tipos de neoplasias malignas, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o TGF- β se posicionam paralelamente à COX-2. Diversas funções desta enzima foram descritas no desenvolvimento de vários carcinomas, como o aumento da proliferação celular, inibição da apoptose, estimulação da angiogênese e inibição da vigilância imunológica, todos com marcada importância na progressão bem-sucedida de tumores (50).

Recentemente, a expressão da enzima COX-2 foi utilizada para diferenciar tumores cartilagosos. Sutton e cols. demonstraram que 54% (13 de 24 casos) dos condrossarcomas apresentavam positividade para esse marcador contra nenhum dos oito encondromas estudados. É possível que esta enzima permita diferenciar neoplasias cartilagosas benignas das malignas (52). Endo e cols. estudaram a expressão da COX-2 citoplasmática, por métodos

imunoistoquímicos, em 74 condrossarcomas e encontraram correlação entre a hiperexpressão deste marcador e duas variáveis, a saber: aumento do grau histológico e decréscimo da sobrevida. Além disso, neste trabalho, os autores observaram que esta enzima não era expressa nos encondromas. Desta forma, a imuno-expressão da COX-2 é um marcador de pior prognóstico e poderia ser utilizada para diferenciar tumores benignos de malignos (53).

Diversos estudos, mais recentes, mostraram que a expressão da COX-2 estava associada com mau prognóstico em diversos tumores de linhagens distintas. No entanto, no sistema músculo-esquelético (osteossarcomas, rabdomyosarcomas e condrossarcomas), a expressão deste marcador evidenciou resultados conflitantes. Enquanto que, em algumas publicações, a hiperexpressão associava-se com prognóstico desfavorável, em outras com aumento no tempo de sobrevida (54-60).

1.10- Padrões de formação de vasos/irrigação sanguínea nos tecidos tumorais

São descritos vários padrões de formação vascular/irrigação sanguínea nos tecidos tumorais, induzidos por diferentes fatores de crescimento (61) (Figura 2):

- a-** Formação de brotos endoteliais: caracterizado pela indução de novos brotos capilares, a partir de vasos pré-existentes no tecido. Neste caso participam o VEGF e o VEGFR2;
- b-** Recrutamento de células progenitoras do endotélio: caracterizado pela formação de novos vasos a partir do recrutamento de células imaturas da corrente sanguínea, induzindo-as a se diferenciar em células endoteliais. Agem o VEGF e o VEGFR2;

- c-** Cooptação vascular: mecanismo próprio de tecidos ricamente vascularizados. Devido à farta oferta de microvasos no tecido sadio, as células tumorais migram para a transição entre a membrana basal endotelial e a célula endotelial propriamente dita, permitindo contato íntimo com a corrente sanguínea. Para viabilizar este processo, as células tumorais secretam VEGF em grande quantidade para inibir a apoptose da célula endotelial. Participam o receptor Tie-2, a angiopoetina e o VEGF;

- d-** Intussuscepção microvascular: caracterizado pela formação de pilares de tecido conjuntivo no interior do lume do vaso. Apesar de não representar uma angiogênese real, facilita a nutrição tumoral pela difusão de nutrientes por estes pilares. Tem ação o PDGF e a angiopoetina;

- e-** Vasculogênese por mimetismo: descrita pela primeira vez no melanoma. É definida pela capacidade única de células tumorais passarem a expressar um fenótipo de células endoteliais, "imitando" o padrão de redes vasculares embrionárias;

- f-** Linfangiogênese: indução da formação de novos vasos linfáticos, pela síntese de VEGF-C e VEGFR3, sendo mais comum em tumores de linhagem epitelial.

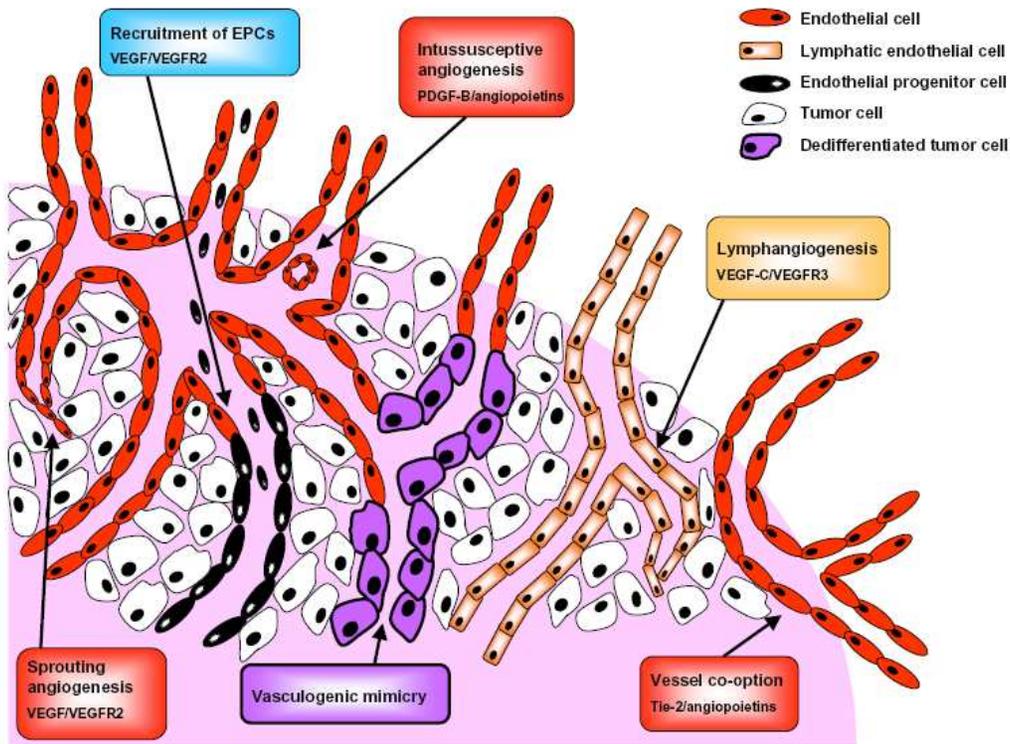


Figura 2- Desenho ilustrativo dos diferentes padrões de vascularização das neoplasias (Hillenet al., 2007)

1.11- Justificativa

As razões que justificaram a realização deste trabalho foram:

- 1- A dificuldade encontrada para o diagnóstico diferencial entre encondromas e condrossarcomas de baixo grau;
- 2- A escassez de estudos em tumores de linhagem cartilaginosa quanto:
 - a- ao papel do VEGF e da COX-2 no seu comportamento biológico;
 - b- à avaliação da proliferação vascular por meio de dois métodos, a saber: densidade microvascular e padrão vascular e sua relação com prognóstico;
 - c- à influência destes fatores na manifestação clínica e graus histológicos destes tumores.



2- OBJETIVOS

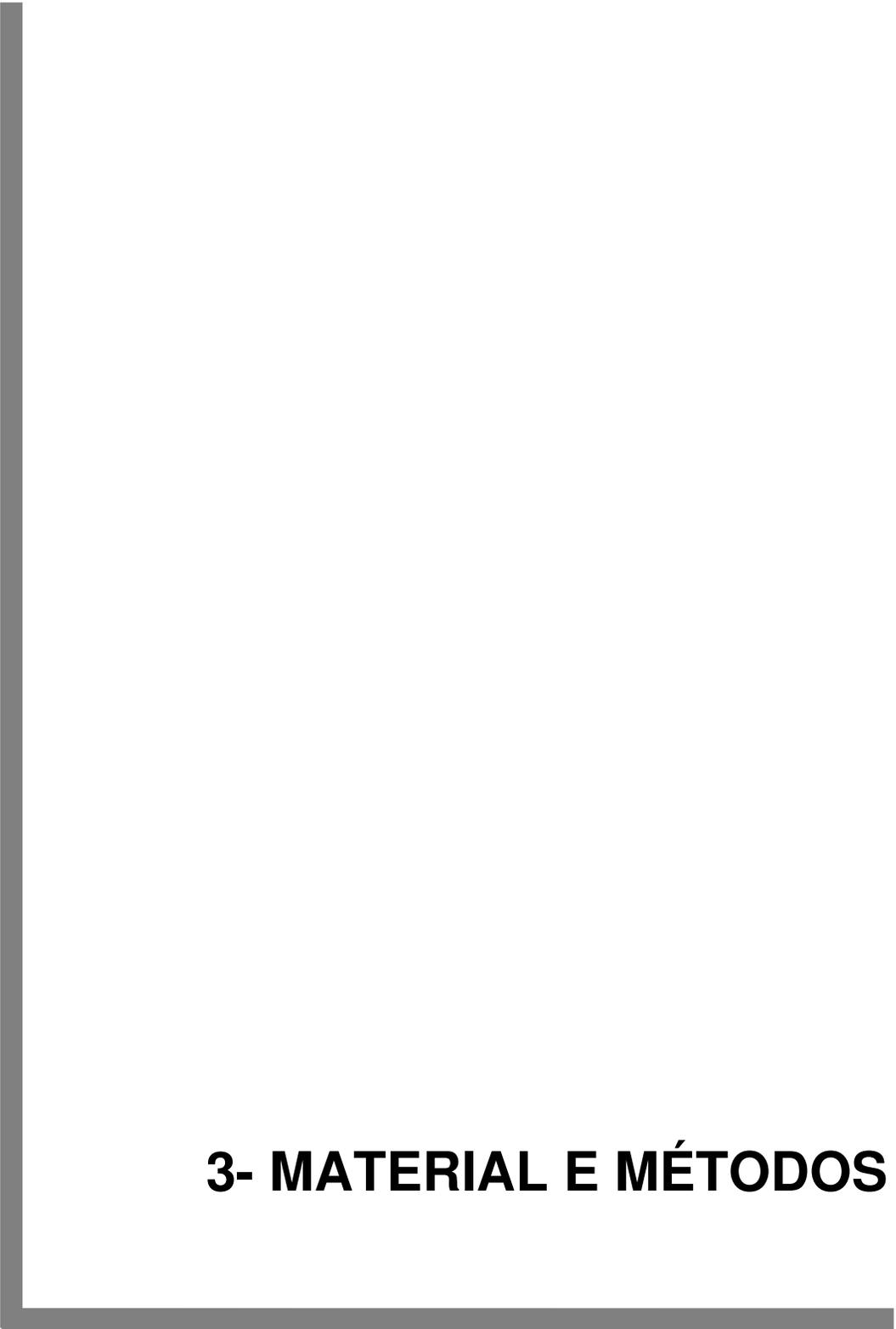
2.1- Geral

Estudar, por meio de marcadores imunoistoquímicos, o papel da angiogênese e da COX-2 em tumores cartilaginosos.

2.2- Específicos

Avaliar, nos encondromas e condrossarcomas clássicos:

- 1-** As características clínicas: sexo, idade, localização tumoral e evolução pós-operatória;
- 2-** A expressão do VEGF nas células neoplásicas;
- 3-** A expressão dos marcadores vasculares CD34 e CD105;
- 4-** A expressão da enzima COX-2 nas células neoplásicas.
- 5-** A correlação entre as expressões dos marcadores VEGF, CD34, CD105 e COX-2 e os achados clínicos, histológicos e de evolução dos pacientes, bem como entre si.



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Avaliação clínica e histológica

No período de setembro de 1988 a janeiro de 2007, 141 pacientes com encondromas (ECs) e condrossarcomas primários (CSs) foram atendidos e tratados no Hospital de Clínicas - Unicamp e no Centro Médico de Campinas. Dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da Unicamp e do Laboratório de Anatomia Patológica - LABAP de Campinas foram coletados os blocos de parafina com o material de cada um dos tumores. Não foram utilizados para a análise os condrossarcomas secundários (osteodondroma /ostecondromatose e encondromatose múltipla). Pelo menos um bloco foi recuperado, de cada tumor. Após a análise histológica destes espécimes, às colorações de rotina, foi separado um bloco de cada paciente que continha material adequado para novos cortes (abundante quantidade de tumor bem fixado). Em dois pacientes foi utilizado o bloco da biópsia diagnóstica por se tratar de tumores irresssecáveis, sendo escolhido este bloco para a análise imunoistoquímica. A graduação histológica se baseou no conjunto das amostras. Caso o bloco escolhido demonstrasse má coloração/negatividade com os marcadores imunoistoquímicos ou a quantidade de neoplasia fosse insuficiente, novo bloco era selecionado.

Os fragmentos dos tumores incluídos em parafina haviam sido fixados em formalina a 10% e, posteriormente, descalcificados com ácido clorídrico ou ácido etilenodiamino-tetra-acético. Os cortes histológicos, em conjunto com as radiografias e história clínica, foram avaliados por dois examinadores (E.M.I.A. e F.F.C.). O diagnóstico e os graus histológicos foram baseados na classificação dos tumores ósseos publicada em 2002 pela Organização Mundial de Saúde (1) (Figura 3). Os condrossarcomas foram subclassificados em três graus: **1-** baixo grau, **2-** grau intermediário e **3-** alto grau).

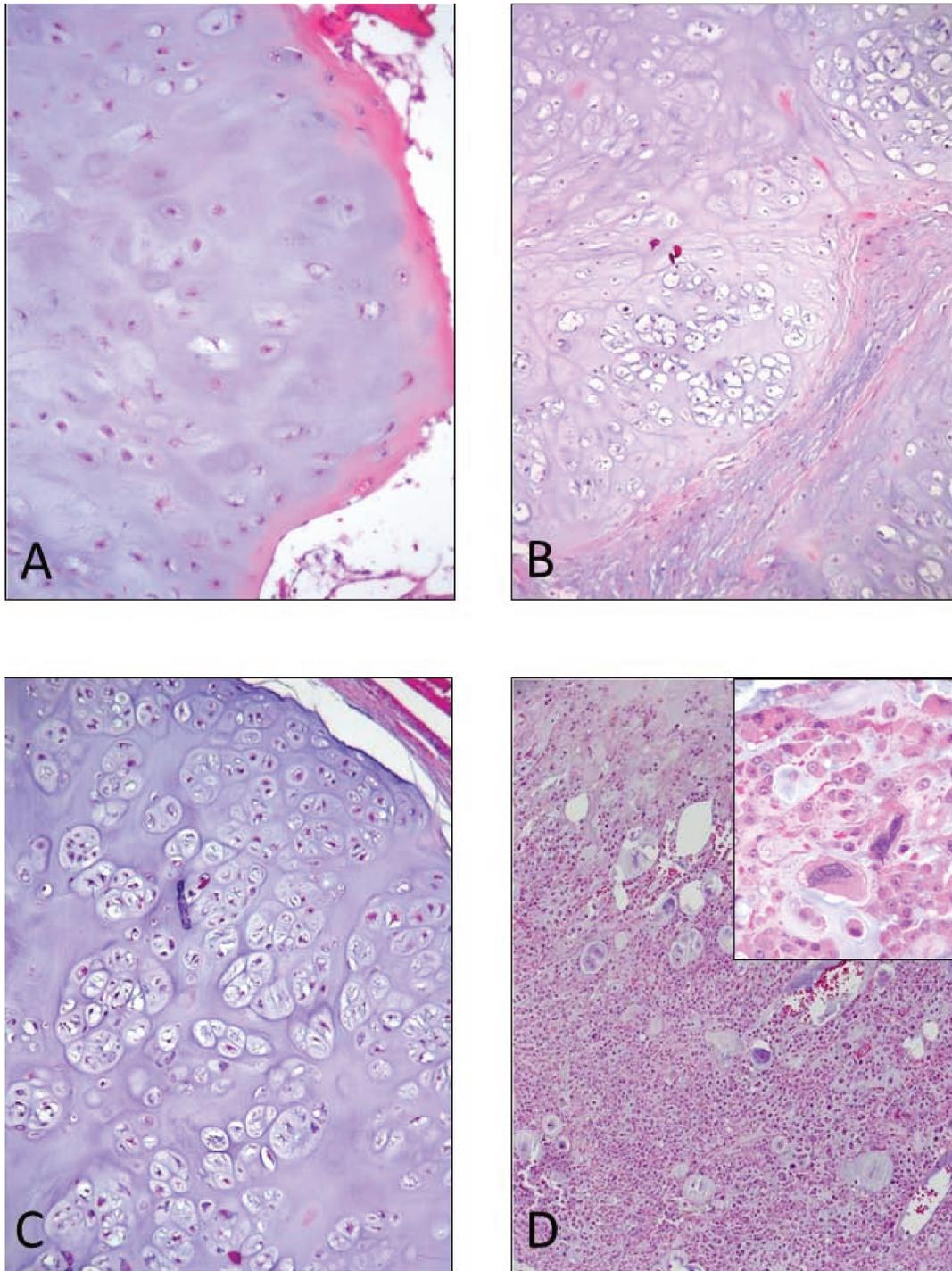


Figura 3- Neoplasias cartilaginosas: diagnóstico e graduação segundo a classificação dos tumores ósseos da Organização Mundial de Saúde (2002). **A-** encondroma; **B-** condrossarcoma grau 1; **C-** condrossarcoma grau 2 e **D-** condrossarcoma grau 3. (H&E, aumento original X100; pormenor X400).

Foram excluídos da análise os tumores com amostras de tecido insuficiente para novos cortes ou apresentando sinais de fixação/descalcificação inadequados (n=54) e condrossarcomas não-convencionais (mesenquimatoso, n=4; desdiferenciado, n=2 e de células claras, n=2). No final, foram incluídos no trabalho 79 pacientes (30 do sexo masculino, 49 do feminino, idade média de 42 anos, variando de 5 a 87 anos).

Não houve perda de dados de seguimento pós-operatório de nenhum dos pacientes selecionados. Os prontuários de sessenta e um pacientes apresentavam dados clínicos completos. Dezoito pacientes deixaram de acompanhar o ambulatório de pós-operatório tardio e foram encontrados ativamente. Destes, cinco haviam falecido devido a complicações do tumor e seus dados foram obtidos por meio do serviço de verificação de óbito. Treze pacientes foram encontrados nos endereços obtidos pelo Serviço Social do HC-Unicamp ou por meio do trabalho das assistentes sociais das suas cidades.

Dos prontuários consultados no Serviço de Arquivo Médico, foram recuperados os seguintes dados:

- 1-** Idade ao diagnóstico;
- 2-** Sexo;
- 3-** Localização do tumor (Figura 4);
- 4-** Tratamento empregado;
- 5-** Tamanho tumoral;
- 6-** Tempo de seguimento;
- 7-** Condição clínica na última avaliação;
- 8-** Evolução:
 - a-** Favorável: sem complicações relacionadas ao tumor;
 - b-** Desfavorável: recidiva, metástases ou óbito relacionado ao tumor.

Vinte e um encondromas (Figura 4) foram estudados e haviam se desenvolvido nas seguintes localizações: rádio (n=2); fêmur (n=2); tíbia (n=1); metacarpo (n=11); falange da mão (n=4) e osso metatársico (n=1).

Os 31 condrossarcomas (Figura 4) de baixo grau apresentaram-se nas seguintes localizações: úmero (n=6); costela (n=3); escápula (n=1); pelve (n=4); fêmur (n=10); tíbia (n=5) e fíbula (n=2).

Os vinte e quatro condrossarcomas de grau intermediário (Figura 4) localizavam-se nas seguintes topografias: úmero (n=6); rádio (n=1); costela (n=3); vértebra lombar (n=1); pelve (n=2); fêmur (n=6); tíbia (n=4) e fíbula (n=1).

Finalmente, três condrossarcomas de alto grau (Figura 4), desenvolveram-se no úmero, escápula e calcâneo.

Com o objetivo de correlacionar os resultados clínicos e histológicos, os pacientes foram divididos em três grupos (Figura 4):

I- encondromas (N=21);

II- condrossarcomas de baixo grau (N=31);

III- condrossarcomas de graus intermediário e alto (N=27).

Devido ao conhecido mau prognóstico associado aos condrossarcomas de ossos chatos (1), a topografia dos tumores foi subdividida em três grupos:

a- Ossos curtos: n=17: dezesesseis encondromas nas seguintes localizações: metacarpo (n=11); falange da mão (n=4); osso metatársico (n=1); um condrossarcoma de alto grau: calcâneo (n=1);

b- Ossos longos: n=48: cinco encondromas e quarenta e três condrossarcomas, nas seguintes localizações: fêmur (n=18); fíbula (n=3); tíbia (n=10); úmero (n=13); rádio (n=3) e vértebra lombar (n=1);

c- Ossos chatos: n=14: todos eles condrossarcomas, nas seguintes localizações: costela (n=6); escápula (n=2) e pelve (n=6).

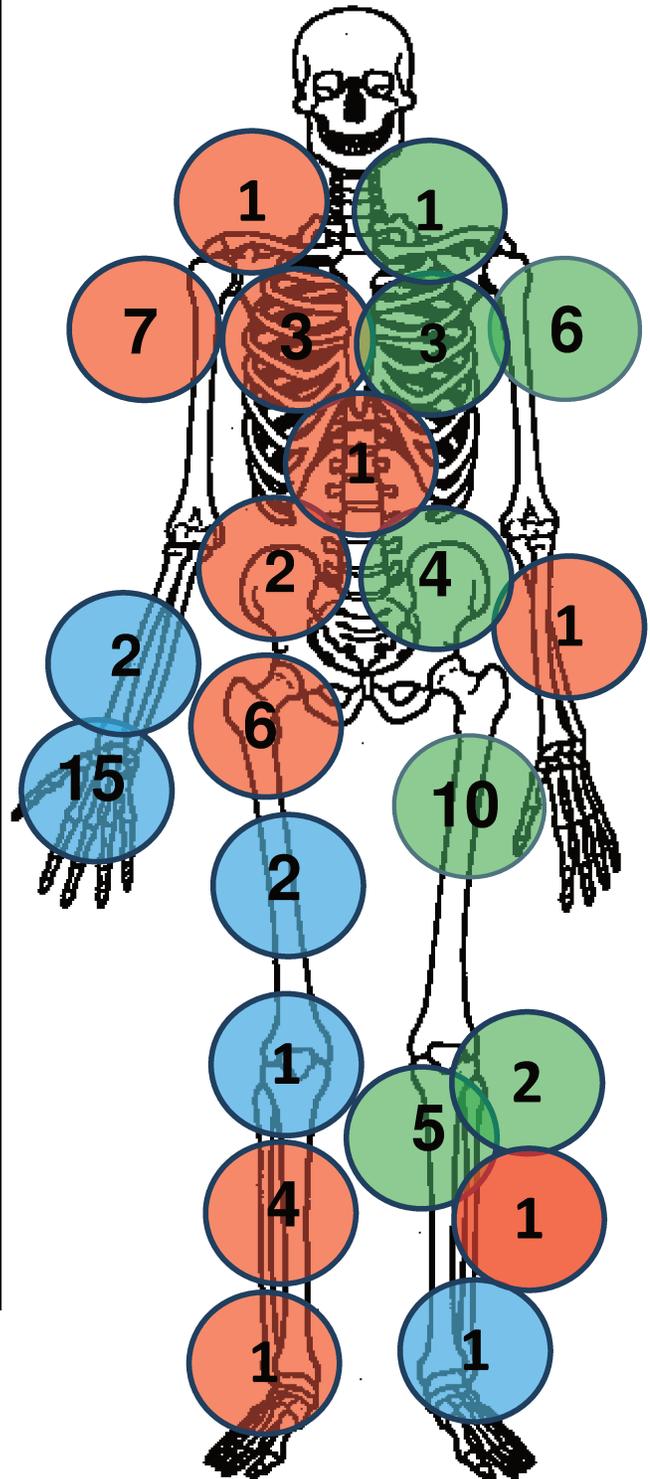
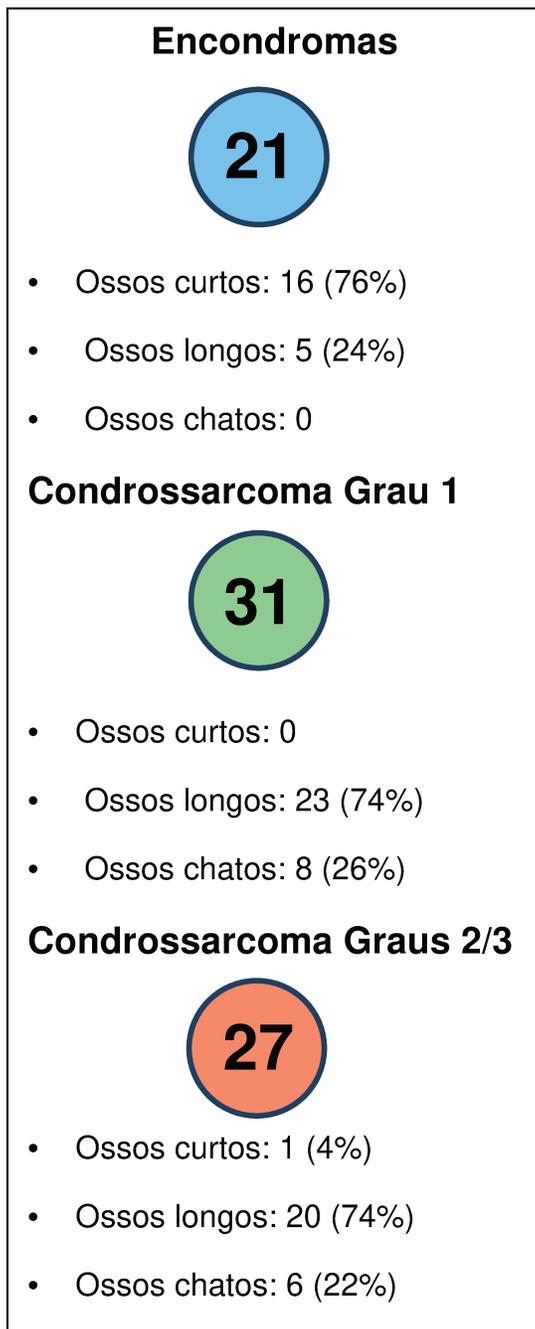


Figura 4- Distribuição topográfica dos tumores cartilaginosos da amostra

Todos os encondromas (n=21) foram tratados por meio de curetagem intralesional. Os condrossarcomas foram operados por meio de: ressecção ampla ou amputação com margem (n=12), ressecção marginal (n=26) e ressecção intralesional/curetagem (n= 18, todos estes condrossarcomas de baixo grau) (62-64). Dois tumores pélvicos eram irressecáveis (sacro e ilíaco), sendo empregadas quimioterapia/radioterapia, após o diagnóstico ser definido por biopsia. Quatro pacientes foram tratados com quimio/radioterapia devido à recidiva local e/ou metástases, depois de operados com ressecção marginal (5,64). Não foram empregados, para análise os blocos coletados após radio/quimioterapia. Os dados coletados sobre o tamanho tumoral e margens cirúrgicas, foram excluídos da análise uma vez que 18 dos 58 condrossarcomas de baixo grau haviam sido tratados por meio de curetagem.

O tempo de acompanhamento foi tabulado considerando o momento da cirurgia até janeiro de 2009, sendo o período mínimo de 24 meses (ou menos, em caso de óbito, como ocorreu com um paciente que veio a falecer 4 meses após a cirurgia). O seguimento médio foi de 77 meses (4-250 meses).

3.2- Avaliação imunoistoquímica

Foram utilizados os anticorpos CD34 (Mo a Hu CD34 Class II, Clone QBEnd 10 - Dako), diluído a 1:50, CD105 (clone SN6h, DaKo Cytomation, Carpenteria, CA, USA), diluído a 1:10, VEGF (A-20; Rabbit Polyclonal IgG 200UG/ML, Santa Cruz), diluído a 1:200 e COX-2 (Diagnostic Biosystems Cyclogenase-2 Antibody clone -4h12), diluído a 1:50 (Quadro 2).

Quadro 2- Anticorpos, clones, diluições utilizados e fornecedores

| Anticorpo anti- | Clone | Diluição | Fornecedores |
|------------------------|--------------|-----------------|----------------------|
| CD34 | QBEnd 10 | 1:50 | Dako |
| CD105 | SN6h | 1:10 | Dako |
| VEGF | A-20 | 1:200 | Santa Cruz Biotech |
| COX-2 | 4h 12 | 1:50 | Diagnostic Byosystem |

As amostras dos tumores em estudo foram cortadas em micrótomo rotativo para blocos de parafina; cortes seriados de 5µm de espessura foram estendidos em lâminas de vidro, previamente emulsionadas com adesivo à base de silano (3- aminopropil-trietoxi-silano), da marca SIGMA, USA (código A-3648) e deixados em estufa a 110°C, durante 2 horas, para a sua adesão à lâmina. A seguir, foram desparafinizados, colocando-se as lâminas em estufa a 60°C por 10 minutos e depois, mantidos em solução de xilol, na estufa, a 60°C, por mais 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em quatro banhos de xilol, dois de álcool absoluto e dois de álcool a 95%, por cinco minutos cada, conforme procedimento histotécnico usual, em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizado o bloqueio da atividade da peroxidase endógena, por meio da imersão das lâminas (três banhos de cinco minutos cada) em peróxido de hidrogênio a 3%, à temperatura ambiente. Após a lavagem com água destilada, seguiu-se à recuperação antigênica, que foi realizada por desnaturação em calor úmido, mediante a incubação dos cortes em solução tampão citrato (pH 6,0), durante 30 minutos a 96°C, exceto para o CD105. Para este anticorpo, a recuperação antigênica foi realizada com pepsina a 0.4% por 30 minutos, a 37°C. Somente os cortes para CD105 foram incubados a 37° C com bloqueador livre de proteína sérica (código x 0909, Dako, SA, Dinamarca) por 30 minutos. Posteriormente, para todos os anticorpos, os cortes foram incubados a 37°C por 30 minutos e, depois, “overnight”, a 4°C, com o anticorpo primário e, em seguida, com o polímero EnVision + Dual Link System-HRP (DAKO cod. K4061), por 1h, a 37°C. Em seguida, os cortes foram

lavados em PBS e corados com 3.3'- tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB), uma lâmina por vez, e contra corados com hematoxilina de Meyer. Nos casos com resultado negativo (não reativo), foi repetido o mesmo processo, de uma a três vezes, nos mesmos blocos ou em novos blocos (total de 106 vezes, sendo 74 para o CD105).

A avaliação dos preparados imunoistoquímicos foi feita, em conjunto, por dois observadores (E.M.I.A. e F.F.C.), em microscópio de co-observador (Nikon). Neste momento, os observadores não tinham acesso aos dados clínicos dos pacientes.

3.2.1- "*Hot spots*"

Como os marcadores não são expressos por todas as células tumorais, como ocorre em tumores epiteliais (32), foi proposta, por alguns autores (22,24,25,53), a avaliação do marcador nos pontos de maior expressão. Estes locais, em que ocorre alta concentração de células imuno-marcadas, são chamados de "*hot spots*" (Figura 5). Todos os casos positivos apresentaram, no mínimo, cinco "*hot spots*".

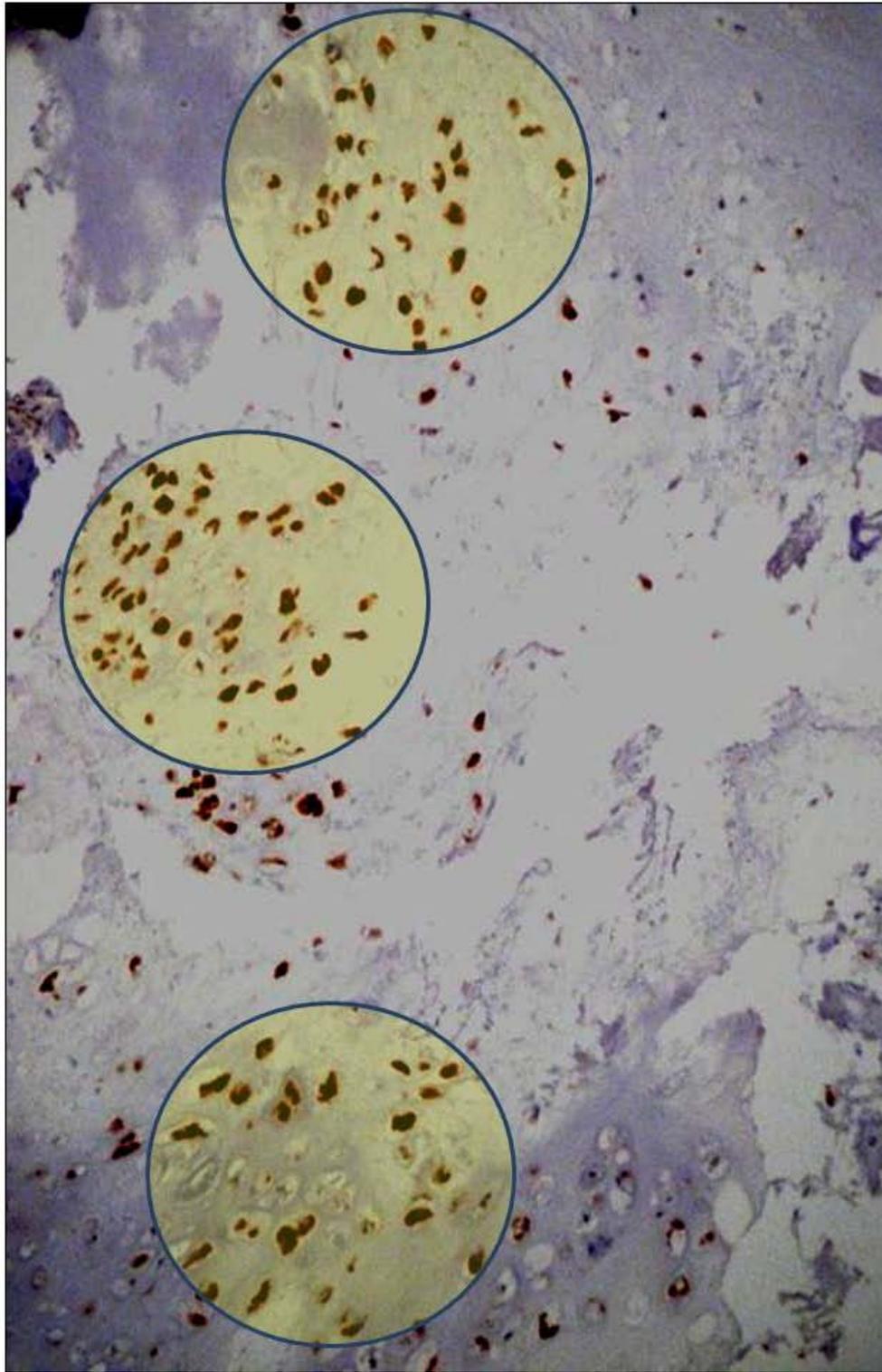


Figura 5- Encondroma: “*hot spots*” de células neoplásicas imuno-marcadas para a COX-2 (aumento original X100)

3.2.2- VEGF

Para a análise do VEGF (Figuras 6 e 7), em primeiro lugar, foram examinados todos os cortes, com o uso de objetiva de pequeno aumento (X 4,5), em microscópio de co-observador, sendo escolhidas cinco áreas com a maior concentração de células imuno-marcadas (*“hot spots”*), definidas por consenso. O índice de imuno-marcação foi definido conforme a porcentagem de células coradas, em relação às não coradas, em cinco *“hot-spots”*, em aumento de X400, conforme Ayala e cols. (24). Estes autores classificaram, de forma subjetiva, a expressão do VEGF, em dois grupos: focal e difusa. O estudo estatístico definiu a classificação em dois grupos: baixa e alta expressão. Os dados de corte para diferenciar os grupos serão descritos nos resultados.

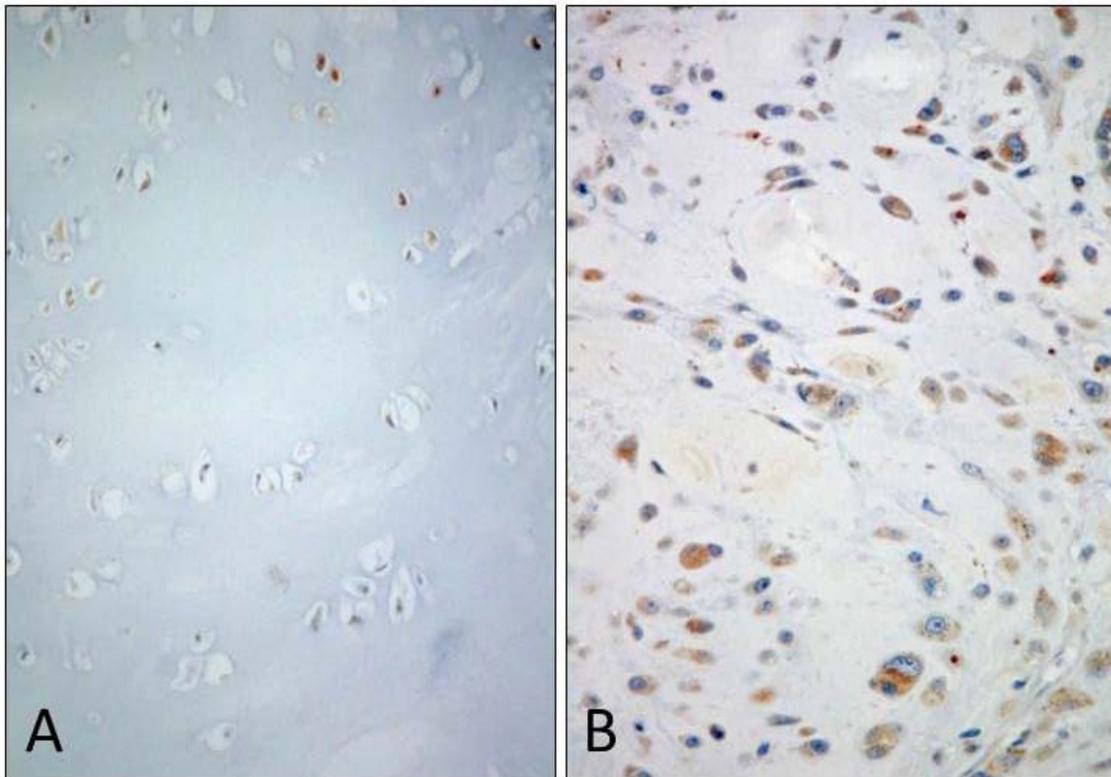


Figura 6- Condrossarcomas grau 1 **A** e grau 2 **B**- células imuno-marcadas para o VEGF: **A**- baixa expressão; **B**- alta expressão (aumento original X100).

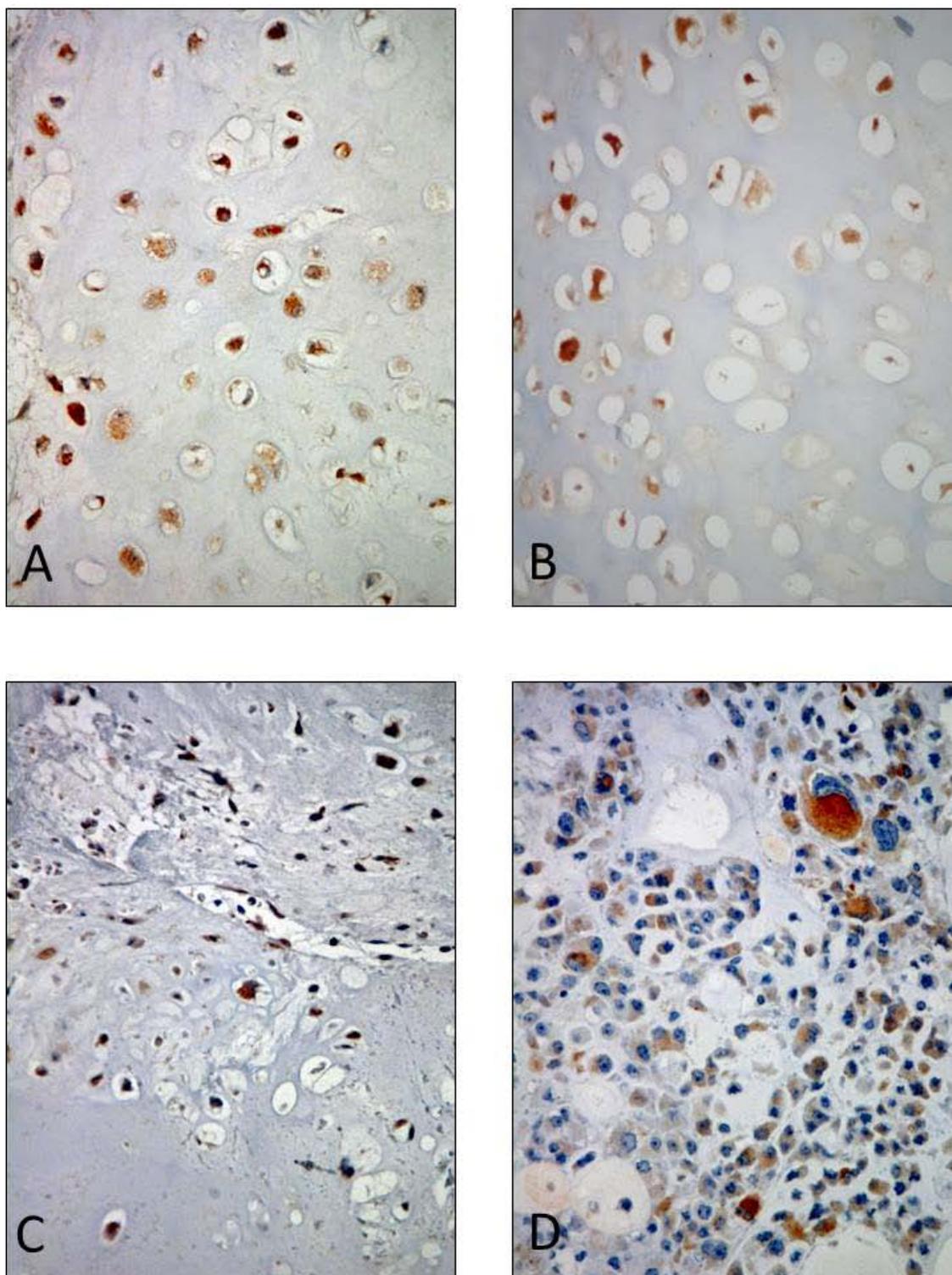


Figura 7- Expressão do VEGF nos diferentes tumores cartilagosos: **A-** encondroma; **B-** condrossarcoma grau 1; **C-** condrossarcoma grau 2; **D-** condrossarcoma grau 3 (aumento original X400)

3.2.3- Densidade microvascular por meio do CD34

Para a análise da densidade microvascular (65), com o angio-marcador CD34 (Figuras 8 e 9), foi realizada uma inspeção panorâmica do corte, sob objetiva de pequeno aumento (X4,5), para a escolha de cinco áreas com a maior concentração de microvasos (*“hot spots”*). Em aumento de X400 (área correspondente a $1,449\text{mm}^2$), a gráticula de Chalkley (Leitz Orthoplan; Leica), dotada de 25 pontos, com a área de contagem correspondente a $0,041\text{mm}^2$ (Figura 8) era posicionada sobre cada *“hot spot”*. A seguir, girava-se a gráticula até encontrar o modo em que um número máximo de pontos fosse coincidente com a parede de vasos ou com as células endoteliais coradas, mesmo que não houvesse lume, no plano de observação. Este procedimento era repetido no total das cinco áreas escolhidas. Microvasos em áreas necróticas ou na região adjacente ao tumor não foram considerados para a contagem (66-68). Através de análise estatística os dados foram classificados em baixa e alta densidade microvascular. O número de corte para diferenciação dos grupos será descrito nos resultados.

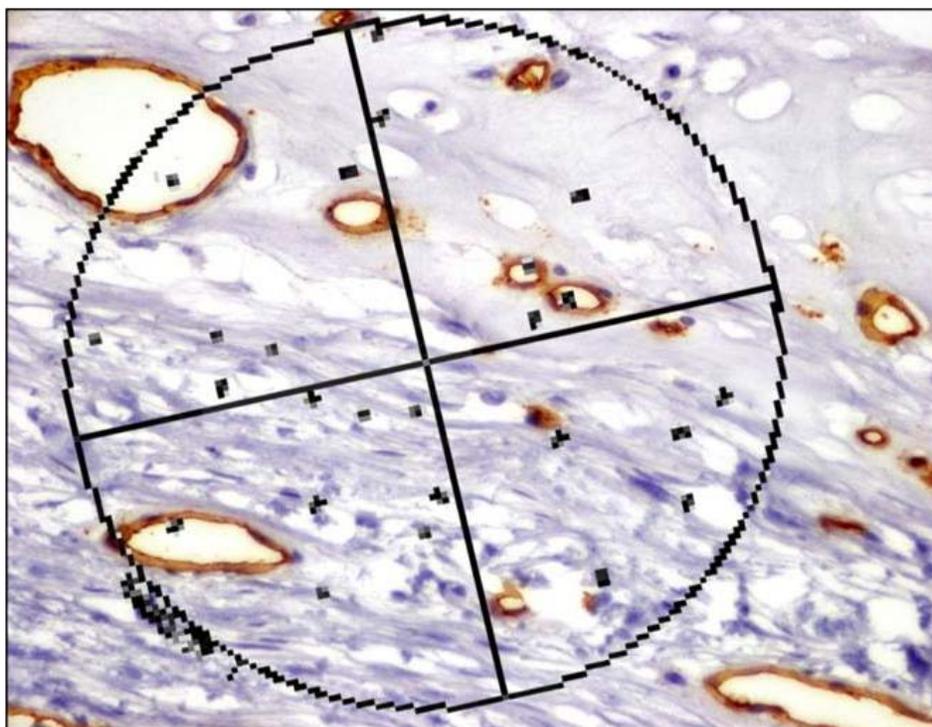


Figura 8- Encondroma imuno-marcado pelo anticorpo anti-CD34: gráticula de Chalkley empregada para a determinação da densidade microvascular (aumento original X400)

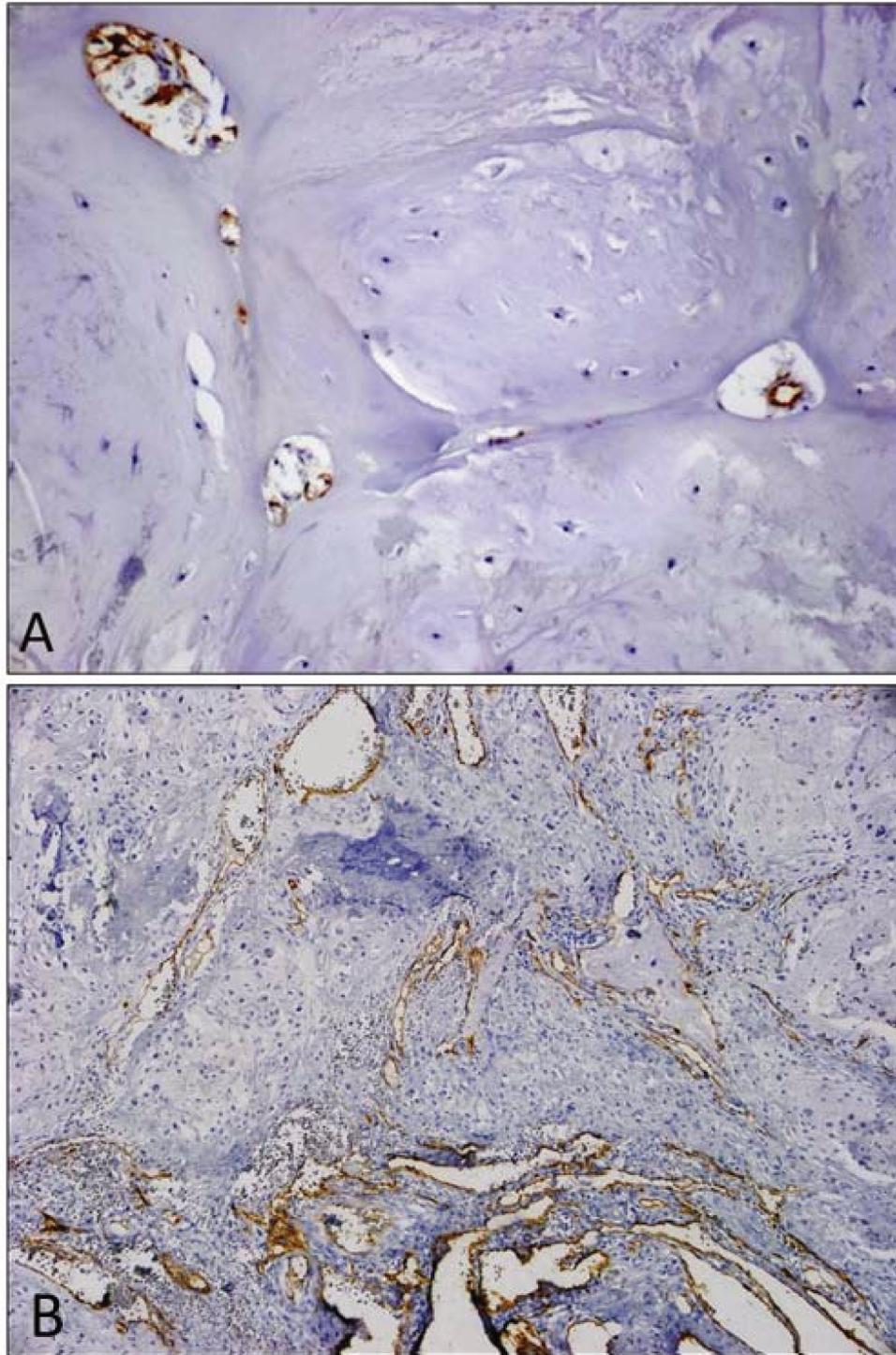


Figura 9- Densidade microvascular (DMV) em tumores cartilagosos imuno-marcados pelo CD34: **A-** encondroma (baixa DMV); **B-** condrossarcoma grau 2 do íliaco (alta DMV) (aumento original X100, pormenor X400)

3.2.4- Padrão vascular por meio do CD34

A análise do padrão vascular foi feita nos cortes imuno-corados pelo CD34 (Figura 10), segundo a descrição de Kalisnski e cols.(11), com as seguintes modificações: **A-** lóbulos tumorais amplos, circundados por delgadas traves conjuntivo-vasculares. (Figura 10A); **B-** lóbulos tumorais pequenos e em maior número, circundados por delgadas traves conjuntivo-vasculares, e/ou com penetração de vasos na periferia do tumor (Figura 10B); **C-** franca vascularização intra-tumoral (Figura 10C).

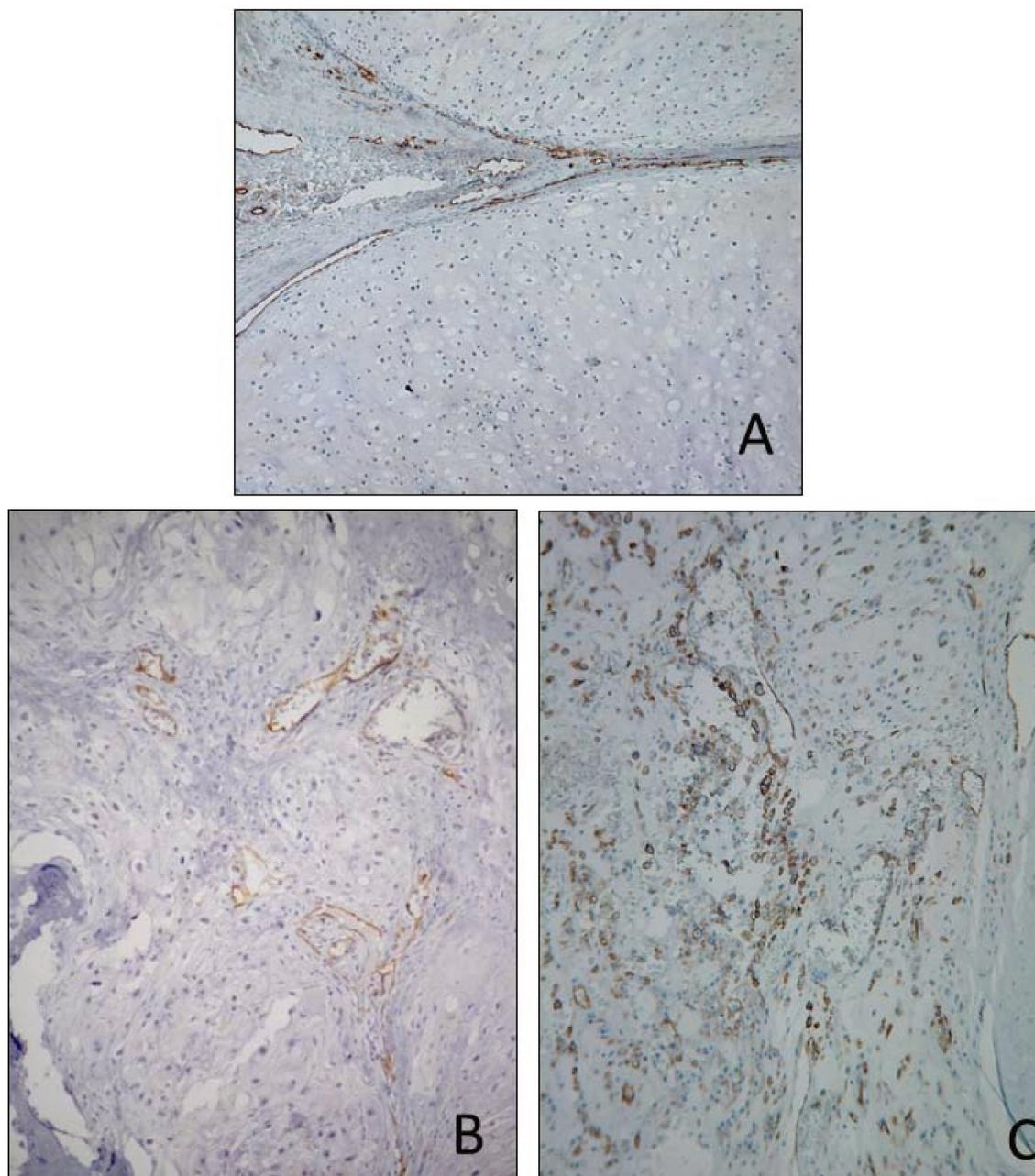


Figura 10- Padrão vascular nos condrossarcomas imuno-marcados pelo anticorpo anti-CD34: **A-** condrossarcoma grau 1 (padrão A); **B-** condrossarcoma grau 2 (padrão B); **C-** Condrosarcoma grau 3 (padrão C) (aumento original X100)

3.2.5- CD105

Dada a escassez dos vasos corados por este marcador, os tumores foram classificados em “positivo ou negativo”, independentemente do número destes vasos (Figura 11).

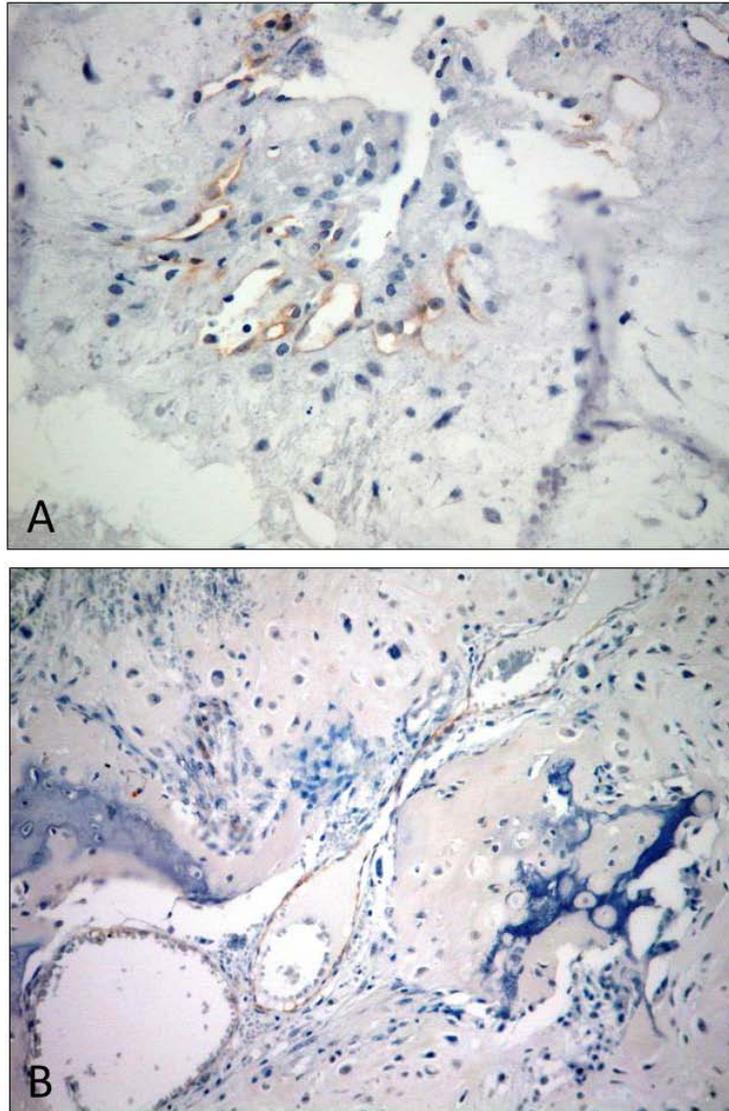


Figura 11- Condrossarcomas imuno-marcados pelo anticorpo anti-CD105: **A-** condrossarcoma grau 1 - vasos penetrando no lóbulo tumoral (aumento original X400); **B-** condrossarcoma grau 2 - vasos presentes na periferia do lóbulo neoplásico (aumento original X100)

3.2.6- COX-2

Para a análise da COX-2 (Figuras 12 e 13), em primeiro lugar foram examinados todos os cortes, com o uso de objetiva de pequeno aumento (X4,5), sendo escolhidas cinco áreas com a maior concentração de células imuno-marcadas (*“hot spots”*), definidas por consenso, em microscópio de co-observação. A seguir, conforme proposto por Endo e cols. (53), foi determinada a proporção de células imuno-coradas, nos cinco *“hot-spots”*, em aumento de X400. A média dos valores das cinco áreas foi classificada da seguinte forma:

0: ausência de expressão;

1+: menos que 10% de células imuno-coradas;

2+: de 10 a 50% de células imuno-coradas;

3+: mais que 50% de células imuno-coradas.

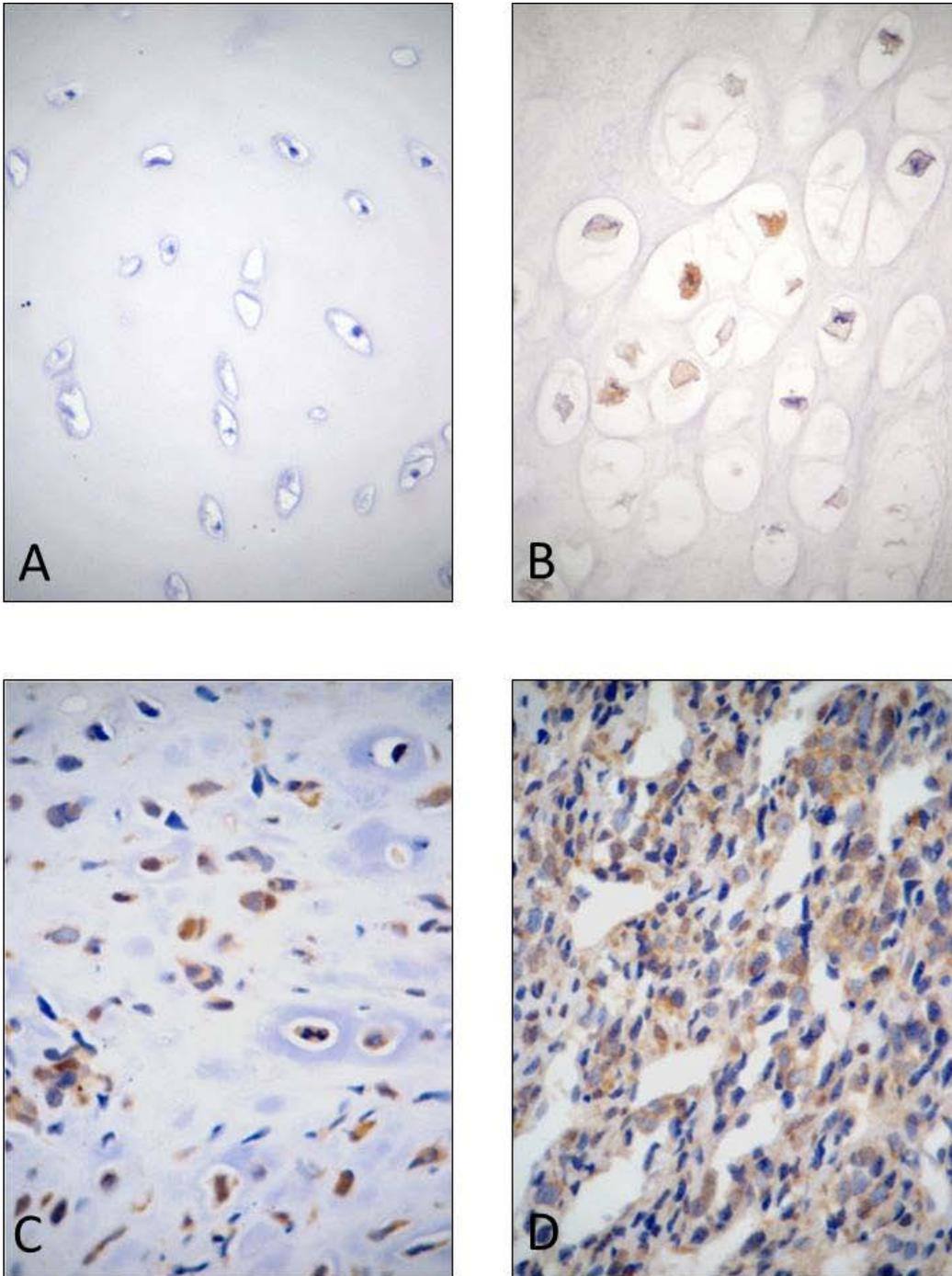


Figura 12- Tumores cartilagenosos imuno-marcados pelo anticorpo anti-COX-2: **A-** ausência de expressão; **B-** expressão em menos de 10% das células neoplásicas; **C-** expressão entre 10 e 50% das células neoplásicas; **D-** expressão em mais de 50% das células neoplásicas (aumento original X400)

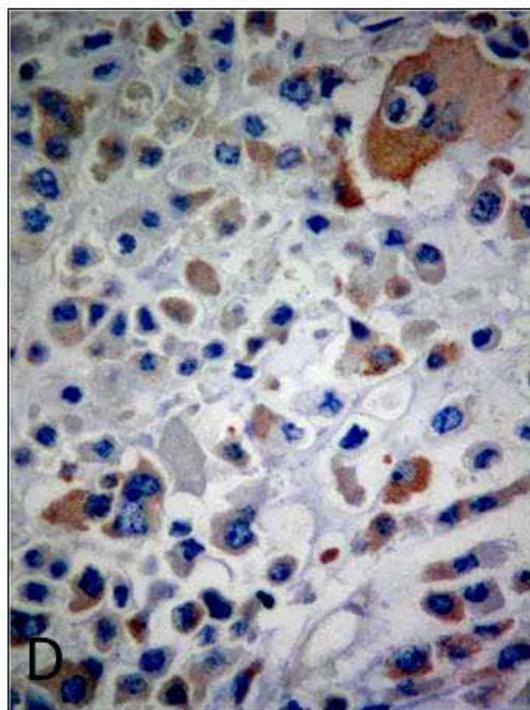
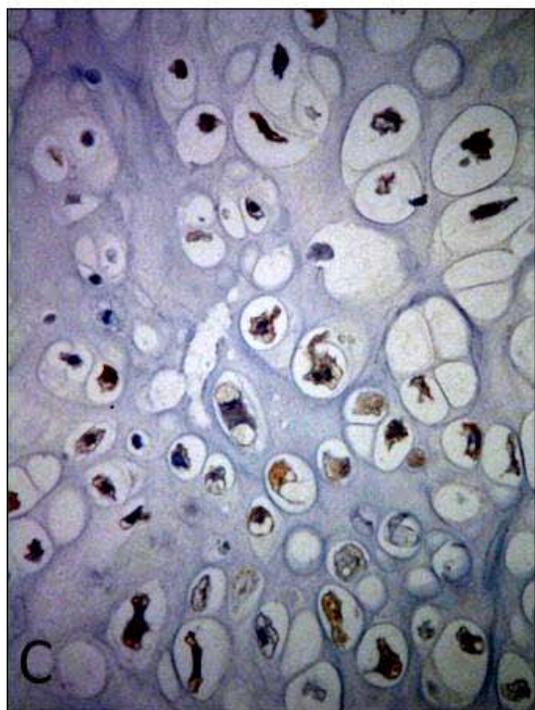
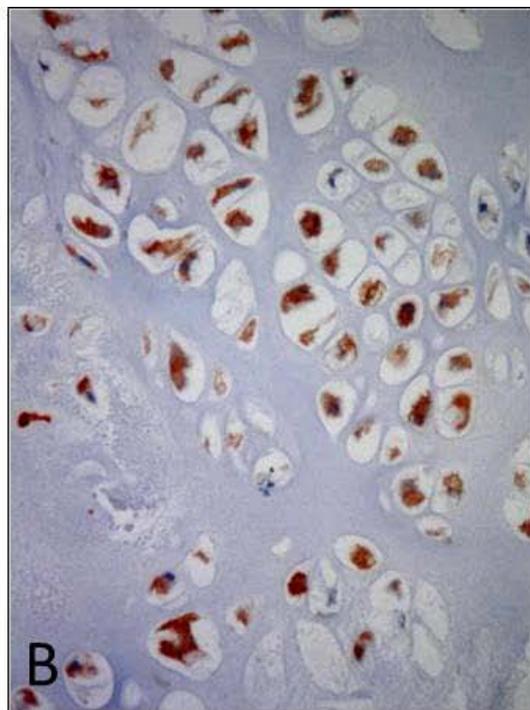
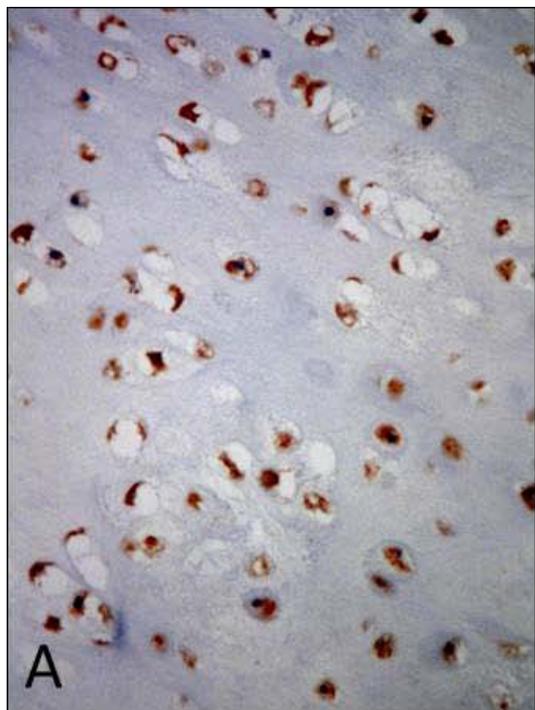


Figura 13- Expressão da COX-2 nos diferentes tumores: **A-** encondroma; **B-** condrossarcoma grau 1; **C-** condrossarcoma grau 2; **D-** condrossarcoma grau 3 (aumento original X400)

3.3- Análise estatística

Para a comparação de proporções, foi utilizado o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando necessário.

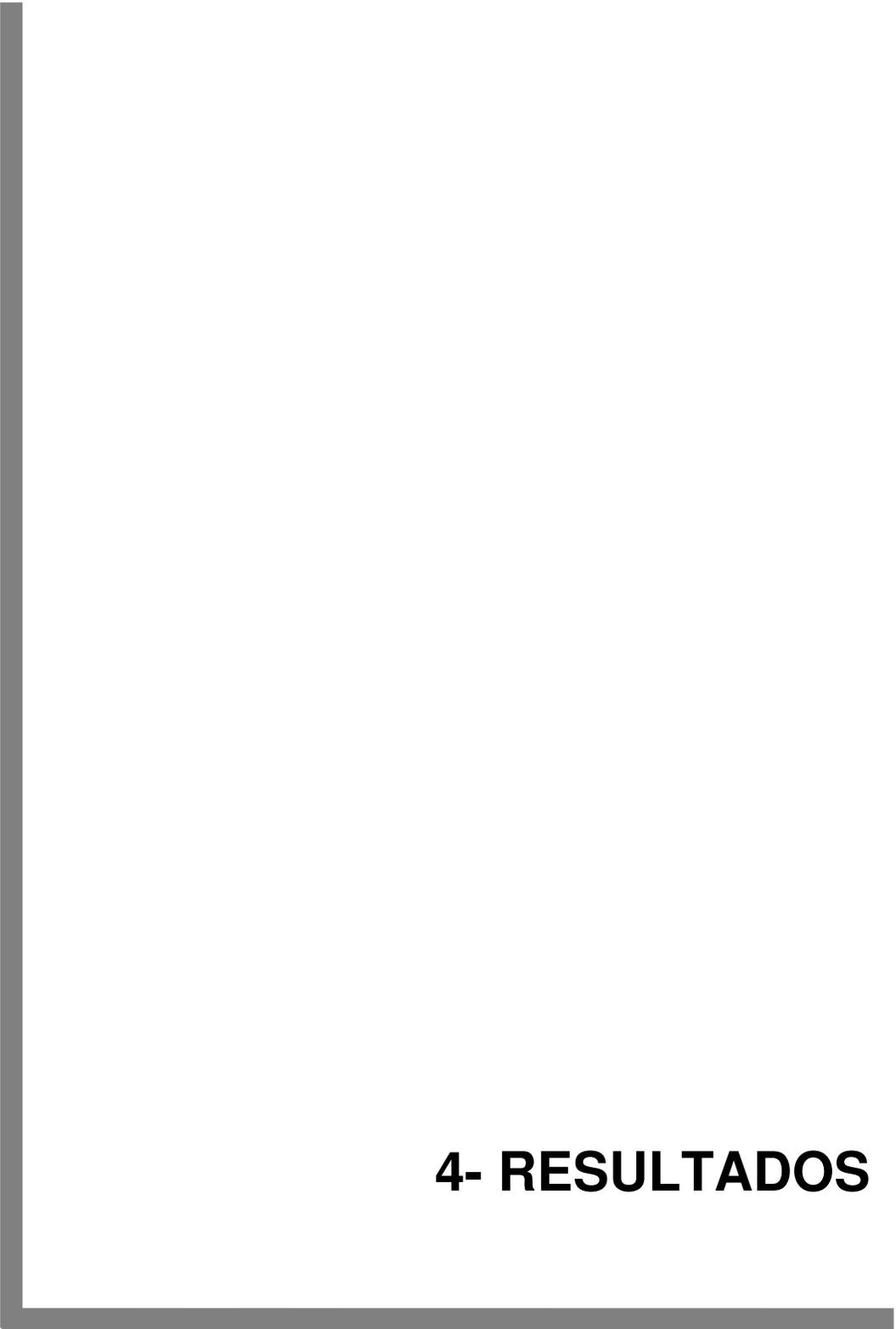
Para a comparação de medidas numéricas entre dois grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney e, entre três ou mais grupos, o teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA com transformação por postos, seguido pelo teste de Tukey, para localização das diferenças, quando necessário.

Para verificar a possível associação linear entre dois marcadores, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Este coeficiente varia de -1 a 1. Valores próximos aos extremos indicam correlação negativa ou positiva, respectivamente, e valores próximos a zero indicam falta de correlação.

Para identificar os fatores que discriminam o grau histológico, foi utilizada a análise de regressão logística múltipla, modelo de logitos generalizados. O processo de seleção de variáveis empregado foi o *stepwise*.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%.

Para a análise dos dados, foi empregado o programa SAS system for Windows (SAS institute Inc, 2002-2008, Cary, NC USA, version 9.2).



4- RESULTADOS

4.1- Dados clínicos

Catorze pacientes apresentaram evolução desfavorável: três no grupo II (metástases: n=1 e recidiva local: n=2) e 11 no grupo III (recidiva local: n=4; óbito: n=7). Nenhum dos encondromas recidivou. Todos os pacientes com condrossarcomas de baixo grau tratados com curetagem (n=18/31) evoluíram bem, sem recidiva e/ou metástase. Não foram observadas diferenças significantes quanto ao tempo de seguimento, à comparação dos três grupos (p=0,7431). Dados sumariados na tabela 1.

4.2- VEGF

Após a análise estatística o ponto de corte obtido foi a média de 10,5% de células coradas em cinco campos de 400x, sendo assim classificado:

- a-** Baixa expressão: média menor ou igual a 10,5%;
- b-** Alta expressão: média maior que 10,5%.

O VEGF foi hiperexpresso em 41% dos encondromas (grupo I), 48% dos CSs de baixo grau (grupo II) e em 59% dos CSs de graus intermediário/alto (grupo III). Dados sumariados na tabela 1.

4.3- Densidade microvascular aferida pelo CD34

Após a análise estatística o ponto de corte obtido foi a média de 5,9 pontos em cinco campos de 400x, sendo assim classificada:

- a-** Baixa densidade microvascular: média menor ou igual a 5,9 pontos;
- b-** Alta densidade microvascular: média maior que 5,9 pontos.

Alta densidade microvascular, aferida pelo CD34, sob o uso da gráticula de Chalkley, apresentou-se em nenhum (0%) dos encondromas (grupo I), quatro (13%) dos CSs de baixo grau (grupo II) e 20 (74,1%) dos CS de moderado/alto graus. Um caso não apresentou positividade ao marcador, sendo desconsiderado para esta parte da análise (utilizamos 78 casos). Dados sumariados na tabela 1.

4.4- Padrão vascular aferido pelo CD34

O padrão vascular do tipo “A” (grandes lóbulos neoplásicos circundados por traves conjuntivas) esteve presente em 19/21 dos encondromas, 24/31 dos CSs de baixo grau e em 10/26 CSs de graus moderado e alto. O padrão “B” (pequenos lóbulos neoplásicos circundados por traves conjuntivas ou vasos penetrando na periferia dos lóbulos) foi identificado em dois encondromas, sete CSs de baixo grau e 15 CSs de graus moderado/alto. Apenas um tumor foi classificado como tipo “C” (condrossarcoma de alto grau). Para fins estatísticos, os padrões “B” e “C” foram analisados em conjunto. Uma das neoplasias não apresentou reação ao marcador CD34, sendo excluída desta parte da análise. Dados sumariados na tabela 1.

4.5- CD105

Apenas 18 dos tumores mostraram vasos imuno-marcados pelo CD105, sendo baixa a contagem de Chalkley (mínimo de um, máximo de cinco vasos corados em todos os campos avaliados). A imuno-expressão do CD105 foi observada em quatro encondromas, quatro CSs grau 1, sete CSs grau 2 e três CSs grau 3. Dada a baixa expressão deste marcador, estes resultados não foram empregados para a análise estatística. Dados sumariados na tabela 1.

4.6- COX-2

Utilizando o método de Endo e cols. (53), a COX-2 foi considerada como hiper-expressa quando a contagem das células imuno-marcadas estava acima de 10%. 19/21 (90,4%) encondromas, 11/31 (35,4%) CSs grau 1 e 12/27 (44,4%) CSs graus 2 e 3 expressavam este marcador. 10/21 (47,6%) encondromas, 4/31 (12,9%) CSs grau 1 e 6/27 (22,2%) CSs graus 2 e 3 apresentaram hiperexpressão da COX-2. Dados sumariados na tabela 1.

Tabela 1- Tumores cartilagosos: achados clínicos e imunoistoquímicos

| Variável | Grupo I (n=21 ENC) | Grupo II (n=31 CS1) | Grupo III (n=27 CS2/CS3) |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Sexo | | | |
| Masculino | 7 (33,33%) | 13 (41,93%) | 10 (37,03%) |
| Feminino | 14 (66,67%) | 18 (58,07%) | 17 (62,97%) |
| Idade ao diagnóstico (anos) | 29,6 | 43 | 50 |
| Seguimento (meses) | 98 | 66 | 71 |
| Localização | | | |
| Ossos curtos | 16 (76,2%) | 0 | 1 (3,7%) |
| Ossos longos | 5 (23,8%) | 23 (74,20%) | 20 (74,1%) |
| Ossos chatos | 0 | 8 (25,8%) | 6 (22,22%) |
| VEGF | | | |
| ≤10,5% | 11 (52,38%) | 17 (54,84%) | 14 (51,85%) |
| >10,5% | 10 (47,69%) | 14 (45,16%) | 13 (48,15%) |
| CD34ⁿ | | | |
| ≤5,9 | 21 (100%) | 27 (87%) | 19 (73,0%) |
| >5,9 | 0 | 4 (13%) | 7 (27,0%) |
| Padrão Vascularⁿ | | | |
| A | 19 (90,5%) | 24 (77,4%) | 10 (37%) |
| B | 2 (9,5%) | 7 (22,6%) | 15 (55,5%) |
| C | 0 | 0 | 1 (7,5%) |
| CD105 | | | |
| Positivo (presença) | 4 (19%) | 4 (12,9%) | 10 (37%) |
| Negativo (ausência) | 17 (71%) | 27 (87,1%) | 17 (63%) |
| COX-2 | | | |
| sem expressão | 2(9,5%) | 20 (64,5%) | 15 (55,56%) |
| 0-10% | 9 (42,9%) | 7 (22,6%) | 6 (22,22%) |
| 10-50% | 8 (38,1%) | 4 (12,9%) | 3 (11,11%) |
| >50% | 2(9,5%) | 0 | 3 (11,11%) |
| Evolução clínica | 100% favorável* | desfavorável** em 3 casos (9,6%) | desfavorável** em 11 casos (40,7%) |

*favorável: sem recidiva até o término do estudo

**desfavorável: recidiva, metástase ou óbito relacionado ao tumor

ⁿNota: em um dos tumores (CS III) houve falta de expressão do CD34

4.7- Correlação entre os dados

As seguintes variáveis analisadas se associavam a evolução desfavorável:

- 1- CSs de graus intermediário/alto ($p < 0,0001$) (Tabelas 2 e 3);
- 2- CSs localizados em ossos chatos ($p < 0,0001$) (Tabelas 2 e 4);
- 3- Densidade microvascular alta (contagem média acima de 5,9 pontos, nas células endoteliais imuno-marcadas, em cinco “*hot spots*”), aferida por meio do CD34 ($p = 0,0104$). (Figuras 9A e 9B e Tabelas 2 e 5);
- 4- Subtipos B/C do padrão vascular ($p = 0,0177$) (Tabela 2).

Não foi encontrada correlação estatística entre o prognóstico e as seguintes variáveis: idade ($p = 1,966$), sexo ($p = 0,7293$), expressão do VEGF ($p = 0,2094$) e expressão da COX-2 ($p = 0,3364$) (Tabela 2).

Tabela 2- Condrossarcomas (n=58): correlação entre a evolução e os achados clínicos, histológicos e imunoistoquímicos (excluídos os encondromas)

| Evolução | Favorável (n=44) | Desfavorável (n=14) | P |
|------------------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------|
| Sexo | | | 0,7293* |
| Masculino | 18 (40,1%) | 5 (35,7%) | |
| Feminino | 26 (39,9%) | 9 (64,3%) | |
| Idade (anos) | | | 0,1966* |
| ≤51 | 28 (63,6%) | 3 (21,4%) | |
| >51 | 16 (36,4%) | 11 (78,6%) | |
| Localização | | | <0,0001* |
| Ossos curtos | 1 (2,3%) | 0 | |
| Ossos longos | 36 (81,8%) | 7 (50%) | |
| Ossos chatos | 7 (15,9%) | 7 (50%) | |
| Grau histológico | | | <0,0001* |
| CS1 | 28 (63,6%) | 3 (21,4%) | |
| CS2/CS3 | 16 (36,4%) | 11 (78,6%) | |
| VEGF | | | 0,2094 [‡] |
| ≤ 10,5% | 22 (50%) | 9 (64,3%) | |
| >10,5% | 22 (50%) | 5 (35,7%) | |
| CD34 DMV[†] | | | 0,0104 [‡] |
| ≤5,9 | 37 (84%) | 6 (46,1%) | |
| >5,9 | 7 (16%) | 7 (53,9%) | |
| Padrão vascular[†] | | | 0,0177* |
| A | 30 (68,18%) | 5 (38,45%) | |
| B/C | 14 (31,82%) | 8 (61,55%) | |
| COX-2 | | | 0,3364* |
| sem expressão | 28 (63,6%) | 7 (50%) | |
| <10% | 10 (22,7%) | 3 (21,4%) | |
| 10-50% | 5 (11,3%) | 2 (14,3%) | |
| >50% | 1 (2,4%) | 2 (14,3%) | |

*- teste de Fischer

‡- testes de Mann-Whitney e Anova

[†]Nota: em um dos tumores (CS III) houve falta de expressão do CD34

Tabela 3- Tumores cartilaginosos: correlação entre evolução e grupos

| Evolução | Dado numérico | Grupo | | | |
|---------------------|----------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | Enc | CS1 | CS2/3 | Total |
| Favorável | N | 21 | 28 | 16 | 65 |
| | Porcentagem | 26,58% | 35,44% | 20,25% | 82,28% |
| | Porcentagem do grupo | 100% | 90,32% | 59% | |
| Desfavorável | N | 0 | 3 | 11 | 14 |
| | Porcentagem | 0% | 3,80% | 13,92% | 17,72% |
| | Porcentagem do grupo | 0% | 9,68% | 41% | |
| Total | N | 21 | 31 | 27 | 79 |
| | Porcentagem | 26,58% | 39,24% | 34,18% | 100% |

Valor do $p < 0,0001$ (Teste de Fischer ou Chi quadrado)

Enc: encondromas, CS1: condrossarcomas grau 1; CS2/3: condrossarcomas de graus 2 e 3

Tabela 4- Tumores Cartilaginosos: correlação entre evolução e localização das lesões

| Evolução | Dado numérico | Localização da lesão | | | Total |
|---------------------|----------------------|----------------------|------------|------------|--------|
| | | Osso curto | Osso longo | Osso chato | |
| Favorável | N | 17 | 41 | 7 | 65 |
| | Porcentagem | 21,52% | 51,90% | 8,86% | 82,28% |
| | Porcentagem do grupo | 100% | 85,42% | 50% | |
| Desfavorável | N | 0 | 7 | 7 | 14 |
| | Porcentagem | 0% | 8,86% | 8,86% | 17,72% |
| | Porcentagem do grupo | 0% | 14,58% | 50% | |
| Total | N | 17 | 48 | 14 | 79 |
| | Porcentagem | 21,52% | 60,76% | 17,72% | 100% |

Valor do $p < 0,0001$ (Teste de Fischer ou Chi-quadrado)

Tabela 5a- Tumores cartilaginosos: correlação entre a DMV-CD34 e a evolução

| Evolução | N | Mediana | Desvio-padrão | Mínimo | Mediana | Máximo |
|---------------------|----------|----------------|----------------------|---------------|----------------|---------------|
| Favorável | 64 | 4,9 | 1,3 | 2,2 | 4,8 | 9,0 |
| Desfavorável | 14 | 6,3 | 1,8 | 4,2 | 5,9 | 9,8 |

Valor do $p=0,0108$ (teste de Mann-Whitney e Anova)

Tabela 5b- Condrossarcomas (excluídos os encondromas): correlação entre a DMV-CD34 e a evolução

| Evolução | N | Mediana | Desvio-padrão | Mínimo | Mediana | Máximo |
|---------------------|----------|----------------|----------------------|---------------|----------------|---------------|
| Favorável | 43 | 4,8 | 1,3 | 2,2 | 4,8 | 8,0 |
| Desfavorável | 14 | 6,3 | 1,8 | 4,2 | 5,9 | 9,8 |

Valor do $p=0,0104$ (teste de Mann-Whitney e Anova)

A análise multivariada (teste de Kruskal-Wallis, ANOVA e Tukey) mostrou correlação positiva entre a o aumento da angiogênese e a localização dos CSs em ossos chatos ($p=0,0036$) (Figura 1B). Estes apresentaram média de 6,1 vasos imuno-corados pelo CD34, à contagem média pelo método de Chalkley, comparativamente com a média de 4,7 vasos nos ossos longos e 4,6 nos curtos (Tabela 6).

Tabela 6- Condrossarcomas: análise multivariada entre a densidade microvascular aferida por meio do CD34 e a localização tumoral

| | N | Média | Dp | Mínimo | Mediana | Máximo |
|-------------------|----------|--------------|-----------|---------------|----------------|---------------|
| Osso curto | 17 | 5 | 0,9 | 3,2 | 5 | 6,6 |
| Osso longo | 48 | 4,9 | 1,5 | 2,2 | 4,6 | 9 |
| Osso chato | 13 | 6,3 | 1,4 | 4,4 | 6 | 9,8 |

valor do p=0,0036

Teste de Kruskal-Wallis e ANOVA seguido pelo teste de Tukey

O aumento da densidade microvascular, aferida pelo método de Chalkley, nos cortes corados pelo CD34, se correlacionou com a hiperexpressão da COX-2 (acima de 10% de células coradas em cinco *hot spots*) (p=0,0168 - Método de ANOVA seguido pelo teste de Kruskal-Wallis). O coeficiente de correlação de Spearman não demonstrou correlação entre a densidade microvascular (CD34) e os valores do VEGF (p=0,26527) (Tabela 7).

Tabela 7- Condrossarcomas: análise multivariada comparativa da expressão da COX-2 com a do VEGF e a densidade microvascular, aferida por meio do CD34

| Expressão da COX-2 | Variável | N | Média | DP | Mínimo | Mediana | Máximo |
|---------------------------|-----------------|----------|--------------|-----------|---------------|----------------|---------------|
| sem expressão | CD34 | 37 | 5,0 | 1,7 | 2,2 | 4,6 | 9,8 |
| | VEGF | 37 | 21,1 | 26,8 | 0,0 | 0,0 | 82,0 |
| <10% | CD34 | 22 | 4,8 | 0,9 | 3,6 | 4,6 | 7,8 |
| | VEGF | 22 | 24,5 | 27,6 | 0,0 | 7,5 | 73,0 |
| 10-50% | CD34 | 14 | 5,7 | 1,3 | 3,6 | 5,7 | 9,0 |
| | VEGF | 15 | 37,9 | 35,9 | 0,0 | 50,0 | 82,0 |
| >50% | CD34 | 5 | 6,5 | 1,5 | 5,4 | 6,0 | 9,0 |
| | VEGF | 5 | 15,0 | 17,5 | 0,0 | 8,0 | 38,0 |

Valores do p: COX-2 xCD34=0,0168, COX-2 xVEGF=0,3585,

Coefficiente de correlação de Spearman; CD34 x VEGF: p=0,26527,

Testes de Kruskal-Wallis, Anova (transformação por postos) e Tukey (localização das transferências)

Os padrões vasculares tipos B/C (pequenos lóbulos circundados por traves conjuntivas, com ou sem vasos na periferia ou ampla vascularização tumoral) se correlacionaram com a expressão elevada do VEGF (acima de 10,5% de células coradas em cinco “*hot spots*”) ($p < 0,0001$ - teste de Fischer). Não foi encontrada correlação entre o padrão vascular e: 1- a localização tumoral ($p = 0,203$) e 2- a expressão da COX-2 ($p = 0,3814$) (Tabela 8).

Também não foi encontrada correlação estatística entre os valores da densidade microvascular e o padrão vascular, avaliados por meio do CD34 ($p = 0,213$ - teste de Mann-Whitney) (Tabelas. 8 a 9). Enquanto a densidade microvascular se correlacionou com a hiperexpressão da COX-2, o padrão vascular demonstrou correlação com a hiperexpressão do VEGF. Ainda houve um único tumor que não expressou o CD34, mas que apresentou forte positividade para os marcadores VEGF e COX-2. Esta neoplasia, em particular, não foi incluída para estas análises.

Tabela 8- Tumores cartilagosos: análise comparativa entre o padrão vascular e a densidade microvascular (DMV), ambas por meio do CD34

| Padrão Vascular x DMV (CD34) | N | Média | DP | Mediana | Mínimo | Máximo |
|---|----------|--------------|-----------|----------------|---------------|---------------|
| Padrão vascular A | 54 | 3,51481 | 2,71755 | 4,4 | 0 | 9,8 |
| Padrão vascular B/C | 24 | 4,19167 | 3,28129 | 4,9 | 0 | 9 |

$p = 0,213$ (teste de Mann-Whitney)

Tabela 9- Tumores cartilaginosos: análise comparativa entre o padrão vascular (por meio do CD34) e as variáveis VEGF, COX-2 e localização tumoral

| Variável | Padrão vascular A ⁿ | Padrão vascular B/C | p |
|----------------------------|-----------------------------------|------------------------|---------|
| VEGF | | | |
| Sem expressão | 19 (90,48%) | 2 (9,52%) | 0,0017* |
| <10,5% | 24 (77,42%) | 7 (22,58%) | |
| ≥10,5% | 11 (40,74%) | 15 (55,55%) | |
| Total | 54 | 24 | |
| COX-2 | | | |
| Sem expressão | 28 (52,83%) | 8 (33,33) | 0,3814* |
| <10% | 12 (22,64%) | 9 (37,5%) | |
| 10-50% | 10 (18,87%) | 5 (20,83%) | |
| >50% | 3 (5,66%) | 2 (8,33%) | |
| Localização tumoral | | | |
| Ossos curtos e longos | 47 (87,04%) | 18 (75%) | 0,2037* |
| Ossos chatos | 7 (12,96%) | 6 (25%) | |

*-teste de Fischer

ⁿNota: um tumor não apresentou expressão do CD34

Em relação ao diagnóstico diferencial entre os tumores, os resultados obtidos à análise do padrão vascular não se mostraram úteis para diferenciar o encondroma do condrossarcoma de baixo grau ($p=0,317$). No entanto, os subtipos B e C mostraram forte correlação com os condrossarcomas de graus moderado e alto ($p<0,001$) (Tabela 10). Os padrões B/C apresentaram 6,5 vezes mais chance de ocorrer no grupo III (CSs de graus moderado e alto) que nos outros dois grupos (encondromas e CSs de baixo grau). Desta forma, o padrão vascular permitiu diferenciar os condrossarcomas de baixo grau dos de graus moderado e alto.

Tabela 10- Tumores cartilaginosos: análise comparativa entre o padrão vascular e os subtipos histológicos

| Padrão vascular x subtipo histológico | Enc | CS1 | CS2/3 | Total |
|--|------------|------------|--------------|--------------|
| | 19 | 24 | 11 | |
| Padrão vascular A | (90,48%) | (77,42%) | (42,31%) | 54 |
| | | | 15 | |
| Padrão vascular B/C | 2 (9,52%) | 7 (22,58%) | (57,69%) | 24 |
| Total | 21 | 31 | 26 | 78 |

Encx CS1: p=0,2584 (teste de Fischer)

CS1 xCS2/3: p=0,0005 (teste de Fischer)

Os resultados do estudo não foram úteis para diferenciar encondroma de condrossarcoma de baixo grau (Tabela 11).

Tabela 11- Tumores cartilaginosos: análise comparativa entre encondroma e condrossarcoma de baixo grau

| Variável | valor do p |
|--------------------------------|-------------------|
| VEGF | 0,4100 |
| COX-2 | 0,2125 |
| Densidade microvascular (CD34) | 0,2247 |
| Padrão vascular (CD34) | 0,2584 |

Teste de Fischer

Finalmente, foi observado um único tumor (CS de alto grau) em que a membrana citoplasmática das células tumorais expressava o CD34, sendo que estas células, muitas vezes, se enfileiravam numa distribuição semelhante a células endoteliais, podendo configurar a angiogênese por mimetismo (Figuras 1 e 13). Neste tumor, o padrão vascular foi tipo C, sendo o único da amostra, com alta densidade microvascular média (de 9 pontos).

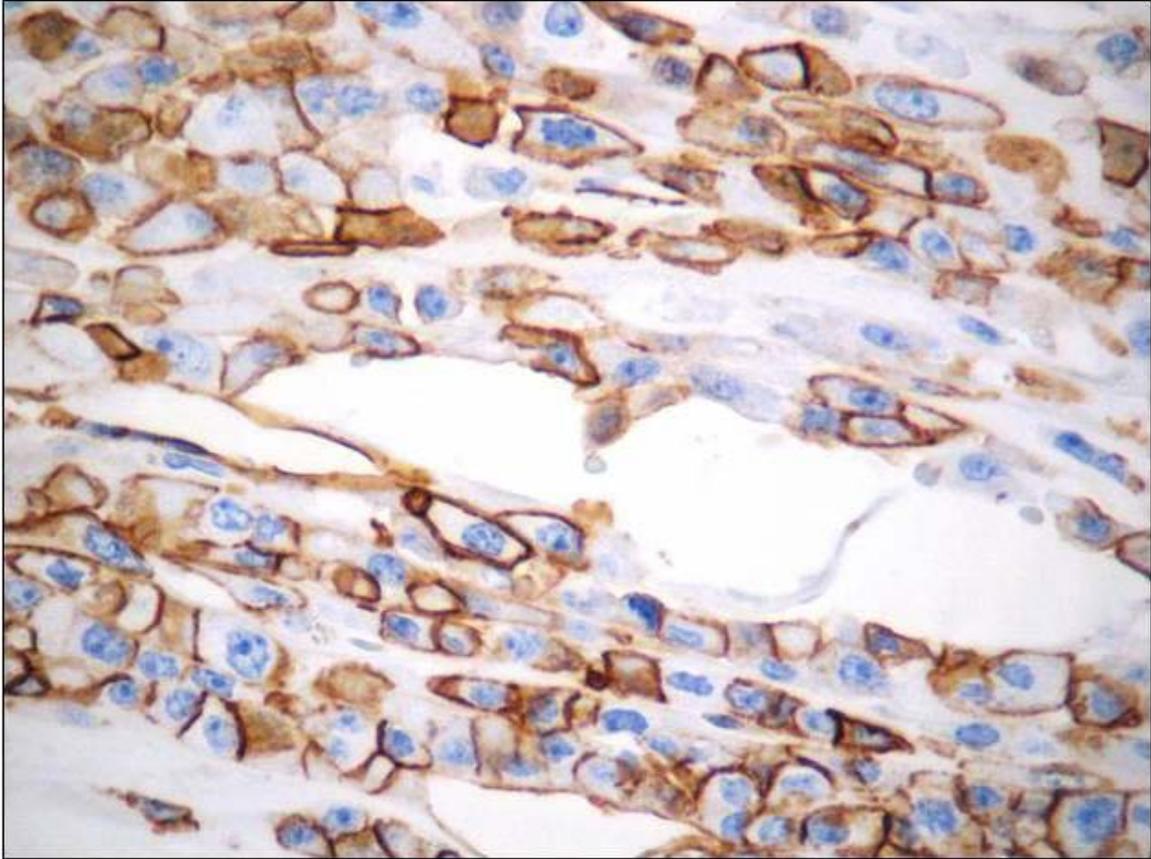


Figura 14- Condrossarcoma grau 3: expressão do anticorpo anti-CD34, na membrana das células neoplásicas; estas se alinham formando fendas (mimetismo vascular) (aumento original X400)



5- DISCUSSÃO

A graduação histológica, nos condrossarcomas, é considerada o melhor indicador prognóstico (1,2,4), porém é um procedimento subjetivo (7,8). Desta forma, outros métodos complementares têm sido investigados para aprimorar a acurácia prognóstica. Dentre estes se destacam a avaliação da síntese do DNA, citometria de fluxo, marcadores moleculares (como a p53 e o MIB-1), características citogenéticas, histomorfometria e classificações radiográficas. No entanto, nenhum destes métodos tem mostrado especificidade/sensibilidade razoáveis para uso em larga escala (1,3-7).

O presente estudo fornece evidências de que a alta densidade microvascular e os padrões vasculares B e C, observados nos condrossarcomas, estão associados a mau prognóstico. McGough et al. (21), utilizando-se do mesmo método de Chalkley, demonstraram resultados semelhantes. Enquanto que em CSs de baixo grau a contagem total (não a média) foi de 9,3 a 10,3 pontos, nos de moderado e alto graus foi de 45,9 a 46,2. Estes autores, porém, não avaliaram a influência no prognóstico. Nossos resultados diferem dos de Nakagawa e cols. (56), que não encontraram correlação prognóstica com a contagem microvascular. Porém, estes autores não empregaram a gráticula de Chalkley, avaliando a densidade microvascular de forma subjetiva. Os resultados de correlação entre o mau prognóstico e: **1-** graus histológicos mais altos dos condrossarcomas e **2-** sua localização em ossos chatos, observados neste estudo, são conhecidos na literatura médica (1,2,4-6).

Em relação ao padrão vascular, nossos resultados corroboraram os do trabalho de Kalisnki e cols. de 2010 (11). Os padrões vasculares B (em que os tumores têm lóbulos menores, circundados por tecido conjuntivo-vascular) e C (em que há abundante microcirculação intra-tumoral), foram mais frequentes nos tumores de graus moderado e alto. Além disso, foi encontrada correlação positiva entre os padrões B e C e o mau prognóstico. A falta de significância estatística entre a densidade microvascular e o padrão vascular demonstra que se pode ter aumento das traves de tecido conjuntivo peri-tumoral, porém sem aumento paralelo da microvasculatura. Além disso, mostra que ambas as variáveis são

independentes e, sugere que estas podem ser empregadas, em conjunto, como mais uma ferramenta, no aprimoramento da estimativa prognóstica.

Já é descrito há mais de 20 anos (3,4), que condrossarcomas de ossos chatos são mais agressivos que aqueles de ossos longos e curtos, mas não foi proposta nenhuma explicação para este fato. Neste trabalho, foi encontrado aumento significativo da densidade microvascular nos tumores nesta localização e isto poderia justificar a diferença no comportamento biológico. Estudos em animais demonstraram que ossos chatos e longos (sem tumor) apresentam a mesma densidade microvascular (69). Contudo, sabe-se que, nos adultos, a medula óssea vermelha (encontrada no esqueleto axial) apresenta células-tronco e produção de diversos fatores de crescimento (21), o que poderia ser uma das possíveis explicações para este aumento do número de vasos encontrado nos tumores cartilaginosos de ossos chatos.

Do ponto de vista epidemiológico, na amostra deste estudo, a taxa de casos que evoluíram de forma desfavorável (recidiva, metástases ou óbitos) alinha-se à descrita na literatura (3,4,53). Em relação aos condrossarcomas de baixo grau, 3 de 31 pacientes (9,3 %) apresentaram evolução desfavorável, enquanto que, nos tumores de moderado e alto graus, foram 11 em 27 (40,7%). Alguns condrossarcomas de baixo grau foram tratados com ressecção intratumoral (curetagem), mas este tipo de procedimento cirúrgico não se associou a recidiva ou óbito e esta opção terapêutica é recomendada, em diversos artigos, para tumores intracompartimentais (intra-ósseos). A propósito, dentre os tumores malignos do sistema músculo esquelético, o CS de baixo grau é o único em que tal tratamento pode ser empregado, com bons resultados (4,5,62).

Vários estudos foram publicados sobre o papel do VEGF em tumores cartilaginosos, mas a maioria é descritiva (11,20,21,24,26-30). Foi demonstrado que o condrossarcoma é capaz de produzir o VEGF (principalmente os de moderado e alto graus), associando-se ao aumento da vascularização tumoral e peritumoral (11). Foi encontrado, apenas, um estudo sobre o papel deste

marcador no prognóstico de pacientes com condrossarcomas, publicado por Stepanova e cols. (70), em 2002. Estes autores não encontraram correlação entre estas duas variáveis. Nossos resultados se alinham aos destes autores. No entanto, foi observada correlação entre o aumento do número de células que expressaram o VEGF e os padrões vasculares B e C e, portanto, indução a angiogênese, nesses tumores. Este fato sugere que, indiretamente, o VEGF pode se associar ao prognóstico.

Os resultados da análise quantitativa da expressão do VEGF são semelhantes aos de Ayala e cols. (24) e Kalinski e cols. (26,28), ambos os estudos apenas descritivos, que encontraram maior índice de expressão do VEGF nos CSs de graus moderado e alto.

O aumento da expressão e da síntese do VEGF, em tumores de outras linhagens, apresentou correlação com metástases e queda da sobrevivência. Em tumores colo-retais, ocorre aumento da taxa de metástases para o fígado (71). A expressão do VEGF-C, em tumores de mama, associa-se a metástases para linfonodos, devido à linfangiogênese (72-74). Em osteossarcomas, a hiperexpressão do VEGF associa-se à aceleração de crescimento tumoral, metástases e recidiva pós-resssecção cirúrgica, sendo um fator isolado de mau prognóstico (75,76).

O papel da COX-2, no prognóstico dos pacientes com tumores epiteliais, é descrito há mais de duas décadas, principalmente nos da região colo-retal e mama. No entanto ainda não há unanimidade sobre o seu papel nos sarcomas, principalmente nos de linhagem cartilaginosa, sendo, os resultados dos trabalhos, controversos. Endo e cols., em 2006, e Schrage e cols., em 2010 (53,54), encontraram hiperexpressão da COX-2 associada a mau prognóstico em CSs. Nossos resultados, por outro lado, estão alinhados aos de Sutton e cols. (52), que estudaram 32 tumores cartilagosos por Western-Blotting. Nenhuma correlação foi encontrada, por estes autores, entre a expressão da COX-2 e as seguintes variáveis: idade, sexo, estágio clínico, localização anatômica,

metástases e taxa de mortalidade. Também, Nakagawa e cols. (56), estudando 101 exemplares de CSs, não encontraram correlação entre a expressão da COX-2 e o prognóstico. Em um estudo anterior do nosso grupo (77), com 53 CSs (sendo que sete deles eram não convencionais, a saber, quatro mesenquimatosos, dois desdiferenciados e um de células claras), nós verificamos que a hiperexpressão da COX-2 (acima de 50%) associava-se a pior prognóstico. Todos os 6 pacientes com CSs mesenquimatosos e desdiferenciados faleceram em até 24 meses após o diagnóstico. No atual trabalho, nós acrescentamos mais 12 CSs convencionais e excluímos os não-convencionais. Nesta nova amostra, a imuno-expressão da COX-2 já não mostrou correlação prognóstica.

Em outros tumores ósseos, tais como o osteossarcoma, também foram publicados resultados controversos sobre a expressão da COX-2. Xu e cols. (57) observaram que a hiperexpressão da COX-2 associava-se a um melhor prognóstico. Dinckens e cols. (58), por outro lado, não encontraram correlação com a evolução dos pacientes. Finalmente, Liao e cols. (60) e Masi e cols. (59) observaram pior prognóstico e menor sobrevida dos pacientes, quando havia hiperexpressão deste marcador.

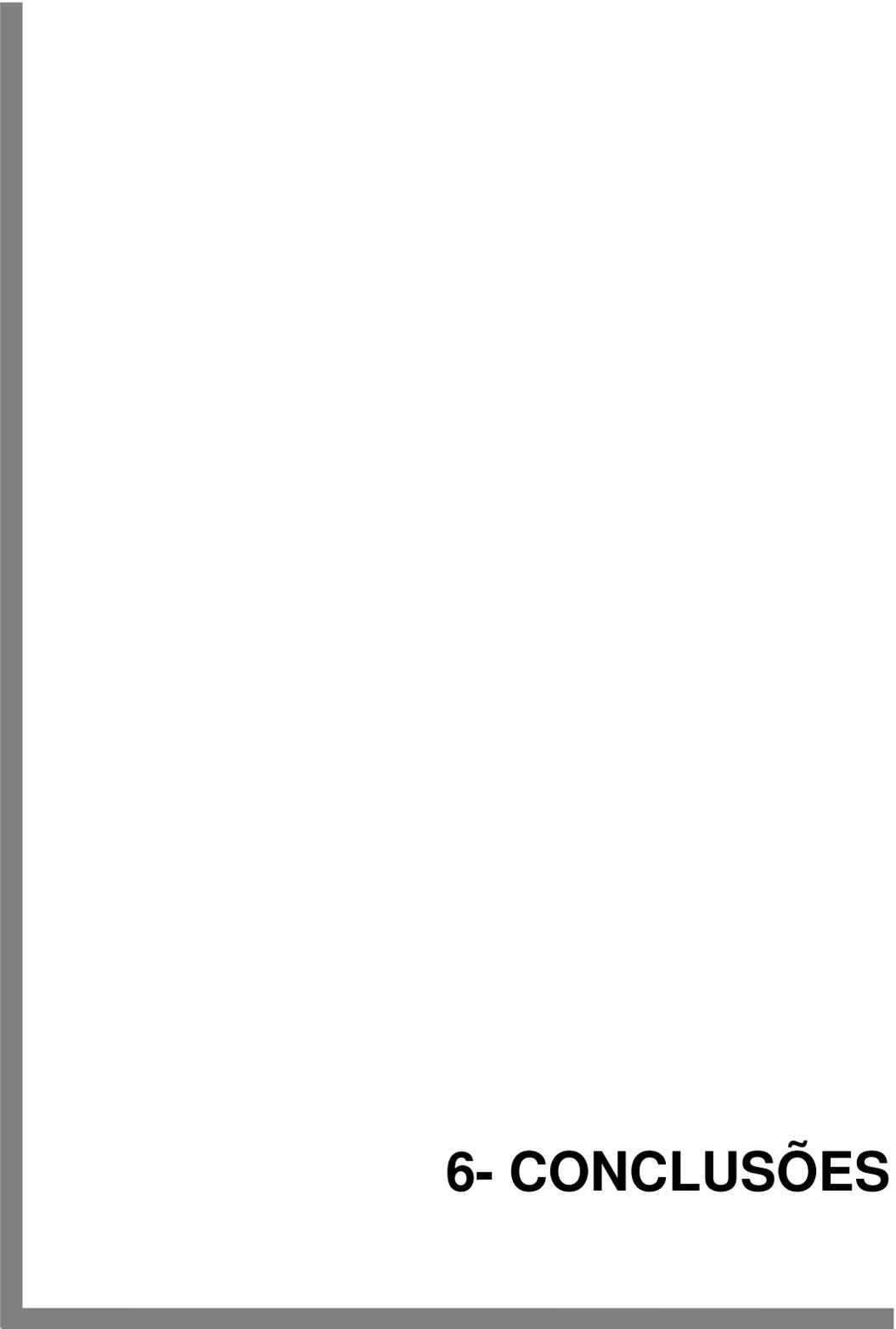
Houve, também, outra diferença entre nossos resultados e os de Endo e cols. (53). Na amostra destes autores, não foi encontrada expressão da COX-2 nos encondromas, enquanto que 90% da nossa casuística apresentavam positividade a imunoistoquímica. Acreditamos haver, pelo menos, dois motivos para explicar estes resultados discordantes: **1-** o clone do anticorpo (COX-2) utilizado nesta tese era diferente daquele do trabalho de Endo e cols.; **2-** problemas relativos ao processamento do material, como na fixação ou descalcificação, podem ter levado à perda dos epítomos. De qualquer forma, encontramos correlação positiva entre a CD34-DMV e a expressão da COX-2, o que reforça o papel já bem estabelecido que a COX-2 exerce sobre a angiogênese (50,51). Portanto, ao menos indiretamente, é possível que esta enzima exerça influência no prognóstico do paciente com condrossarcoma.

Ficou claro, neste estudo, que a hiperexpressão da COX-2 (acima de 10% de células coradas) e do VEGF (acima de 10,5% de células coradas) correlacionou-se, respectivamente, com o aumento da densidade microvascular e com os padrões vasculares B/C, ambos associados a maior agressividade tumoral. Este fato demonstra que tanto um quanto o outro são pró-angiogênicos, atuando, ainda que não diretamente, na evolução insatisfatória destes tumores.

O único caso de condrossarcoma em que as células tumorais apresentavam expressão de membrana do CD34, demonstrando uma possível vasculogênese por mimetismo, também mostrou alta densidade microvascular e padrão vascular do tipo C. Foi tratado com desarticulação do membro superior (já que o tumor se apresentava no úmero proximal). Contrariando todas as expectativas, após quatro anos de pós-operatório, o paciente não apresentava sinais de recidiva ou metástases. Assim, embora o diagnóstico e a estimativa de prognóstico dependam do conjunto dos achados clínicos, de imagem, histológicos, imunoistoquímicos e da conduta terapêutica, há, ainda, muitas variáveis a serem identificadas.

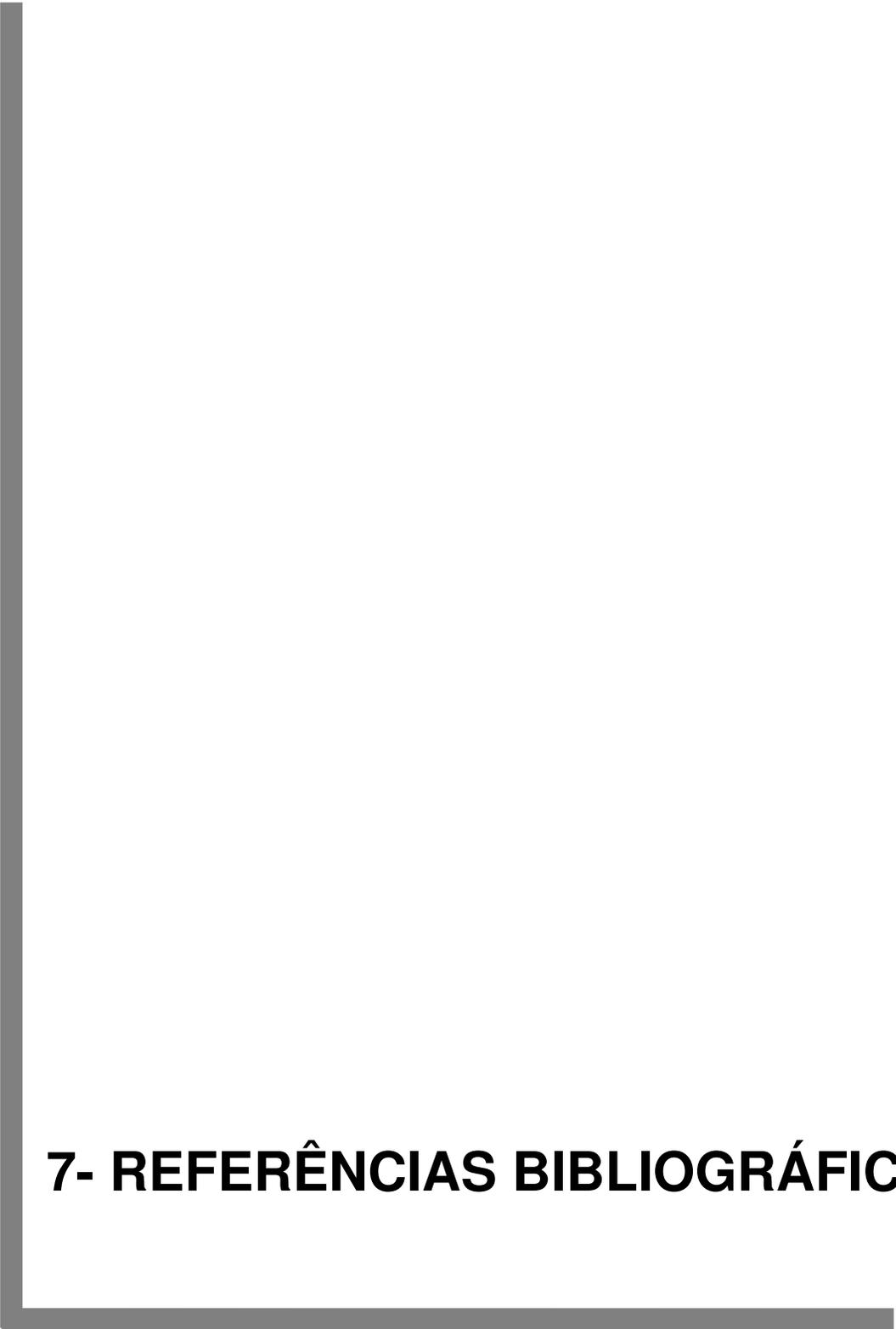
A aplicação do CD105 em sarcomas ainda não foi bem estabelecida (38-40,45). Trabalhos sobre a angiogênese nesses tumores têm demonstrado correlação com o aumento da taxa de crescimento tumoral e queda da sobrevida. No entanto, a maioria dos trabalhos utiliza o CD31 e o CD34 (38,45). Alguns autores demonstraram aumento da expressão do CD105 em alguns sarcomas, porém não estudaram os resultados com relação à sobrevida pós-tratamento (38,45). Não encontramos artigos publicados, na literatura disponível, sobre o papel da endogлина (CD105) nos tumores primários do sistema músculo-esquelético. A falta de expressão deste marcador nos tumores condrais, se deve, provavelmente, à escassez de vasos neo-formados imaturos nestes tumores (11). Nos condrossarcomas, formam-se amplos lóbulos tumorais envoltos por delgadas traves conjuntivo-vasculares, sendo os vasos, em geral, maduros (dada à presença de pericitos e/ou células musculares lisas), e estes vasos maduros perdem a expressão do CD105 (11). São raros e escassos os vasos

presentes no interior dos lóbulos tumorais, exceto nos tumores menos diferenciados. Os únicos tumores que expressaram o CD105 de forma mais intensa (mesmo assim, em número não maior que cinco em todo o corte), foram os de moderado e alto grau (10 em 27 casos deste grupo). É possível que defeitos nos processos de fixação e descalcificação possam ter levado à perda dos epítomos. No entanto, em outros artigos publicados, em que os espécimes estudados haviam sido descalcificados, não foi observado prejuízo na expressão do CD105 (78-80). Além disso, casos que não foram descalcificados (material de biópsia) e que não expressaram o CD105, demonstraram boa qualidade da coloração ao H&E (o que revela uma boa fixação do material. Estes resultados sinalizam que os condrossarcomas, especialmente os de baixo grau, apresentam baixa neoangiogênese, resultando na lenta taxa de crescimento que estes tumores apresentam (28).



6- CONCLUSÕES

- 1- O estudo da angiogênese, nos condrossarcomas clássicos, aferida pela densidade microvascular e padrão vascular, demonstrou-se útil como ferramenta prognóstica.
- 2- A alta densidade microvascular observada nos condrossarcomas de ossos chatos pode explicar a evolução desfavorável dos tumores nesta localização.
- 3- A hiperexpressão dos marcadores VEGF e COX-2 correlacionou-se com o aumento da vascularização, porém não com o prognóstico.
- 4- As variáveis estudadas não se mostraram adequadas para diferenciar o encondroma do condrossarcoma de baixo grau.



7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer*. 1995;75:203-10.
- 2- Terek RM. Angiogenesis in chondrosarcoma. *Curr Opin Orthop*. 2002; 13:449-53.
- 3- Chow WA. Update on chondrosarcomas. *Curr Opin Oncol*. 2007;19:371—6.
- 4- Giuffrida AY, Burgueno JE, Koniaris LG, Gurierrez JC, Duncan R, Scully SP. Chondrosarcoma in the United States (1973 to 2003): an analysis of 2890 cases from the SEER database. *J Bone Joint Surg Am*. 2009;91:1063-72.
- 5- Mayrogenesis AF, Gambarotti M, Angelini A, Palmerini E, Staals EL, Ruggieri P, et al. Chondrosarcomas revisited. *Orthopedics*. 2012;35:379-90.
- 6- Amstalden EMI. Tumores do sistema osteoarticular. In: Billis A, Vassallo J, editors. *Patologia diagnóstica de tumores*. 2nd ed. Campinas. Impressão Digital do Brasil Gráfica e Editora. 2004;345-52.
- 7- Wang XL, De Beuckeleer LH, De Schepper AM, Van Marck E. Low-grade chondrosarcoma vs enchondroma: challenges in diagnosis and management. *Eur Radiol*. 2001;11:1054-7.
- 8- Galant C, Malghem J, Sibille C, Docquier PL, Delloye C. Current limitations to the histopathological diagnosis of some frequently encountered bone tumours. *Acta Orthop Belg*. 2008;74:1-6.
- 9- Grifone TJ, Haupt HM, Podolski V, Brooks JJ. Immunohistochemical expression of estrogen receptors in chondrosarcomas and enchondromas. *Int J Surg Pathol*. 2008;16:31-7.
- 10- Skeletal lesions: interobserver correlation among expert diagnosticians (SLICED) study group. Reliability of histopathologic and radiologic grading of cartilaginous neoplasms in long bones. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89:2113-23.

- 11- Kalinski T, Roessner A. Angiogenesis in cartilage tumors. *Pathologe*. 2010;31 Suppl 2:177-82.
- 12- Weiner SD. Enchondroma and chondrosarcoma of bone: clinical, radiologic, and histologic differentiation. *Instr Course Lect*. 2004;53:645-9.
- 13- Santacreu EMF, Cruz EJO, López JMG, Fernández PE. Enchondroma versus low-grade chondrosarcoma in appendicular skeleton: clinical and radiological criteria. *J Oncol*. 2012;2012:437958.
- 14- Ollivier L, Vanel D, Leclère J. Imaging of chondrosarcomas. *Cancer Imaging*. 2003;4:36-8.
- 15- Kendell SD, Collins MS, Adkins MC, Sundaram M, Unni KK. Radiographic differentiation of enchondroma from low-grade chondrosarcoma in the fibula. *Skeletal Radiol*. 2004;33:458-66.
- 16- Torriani M, Etchebehere M, Amstalden EMI. Sonographically guided core needle biopsy of bone and soft tissue tumors. *J Ultrasound Med*. 2002;21:275-81.
- 17- Vanel D, Kreshak J, Larousserie F, Alberghini M, Mirra J, De Paolis M, et al. Enchondroma vs. Chondrosarcoma: A simple, easy-to-use, new magnetic resonance sign. *Eur J Radiol*. 2012 Jan 5.
- 18- Sulzbacher I, Birner P, Trieb K, Mühlbauer M, Lang S, Chott A. Platelet-derived growth factor- α receptor expression supports the growth of conventional chondrosarcoma and is associated with adverse outcome. *Am J Surg Pathol*. 2001;25:1520-7.
- 19- Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*. 1985;43:175-203.
- 20- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;146:1029-39.

- 21- McGough R, Aswad B, Terek RM. Pathologic neovascularization in cartilage tumors. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;397:76-82.
- 22- Turner HE, Nagy Z, Gatter KC, Esiri MM, Harris AL, Wass JA. Angiogenesis in pituitary adenomas and the normal pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:1159-62.
- 23- Murata M, Yudoh K, Masuko K. The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16:279-86.
- 24- Ayala G, Liu C, Nicosia R, Horowitz S, Lackman R. Microvasculature and VEGF expression in cartilaginous tumors. *Hum Pathol.* 2000;31:341-6.
- 25- Huang SM, Lee JC, Wu TJ, Chow NH. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor for thyroid neoplasms. *World J Surg.* 2001; 25:302-6.
- 26- Kalinski T, Krueger S, Sel S, Werner K, Ropke M, Roessner A. Differential expression of VEGF-A and angiopoietins in cartilage tumors and regulation by interleukin-1b. *Cancer.* 2006;106:2028-38.
- 27- Falcone G, Rossi ED, Maccauro G, de Santis V, Rosa MA, Capelli A, et al. Diagnostic relevance of the immunohistochemical detection of growth factors in benign and malignant cartilaginous tumors. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006;14:334-40.
- 28- Kalinski T, Sel S, Kouznetsova I, Röpke M, Roessner A. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in cartilage tumors. *Pathol Res Pract.* 2009;205:339-45.
- 29- Furumatsu T, Nishida K, Kawai A, Namba M, Inoue H, Ninomiya Y. Human chondrosarcoma secretes vascular endothelial growth factor to induce tumor angiogenesis and stores basic fibroblast growth factor for regulation of its own growth *Int J Cancer.* 2002;97:313-22.

- 30- McGough RL, Lin C, Meitner P, Aswad BI, Terek RM. Angiogenic cytokines in cartilage tumors. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;397:62-9.
- 31- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1996;87:1-13.
- 32- Lindenmayer AE, Miettinen M. Immunophenotypic features of uterine stromal cells. CD34 expression in endocervical stroma. *Virchows Arch.* 1995; 426: 457-60.
- 33- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood.*1990;15:2417-26.
- 34- Brekken RA, Li C, Kumar S. Strategies for vascular targeting in tumors. *In J Cancer.* 2002; 100: 123-30.
- 35- Sanchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, et al. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transformin growth factor- beta pathways. *J Biol Chem.* 2002; 277:43799-808.
- 36- Kumar S, Ghellal A, Li C, et al. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res.* 1999; 59: 856-61.
- 37- Minhajat R, Mori D, Yamasaki F, et al. Endoglin (CD105) expression in angiogenesis of colon cancer: analysis using tissue microarrays and comparison with other endothelial markers. *Virchows Arch.* 2006; 44: 127-34.
- 38- Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology.*2005; 46:481-9.
- 39- Duff SE, Li C, Garland JM, et al. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 2003; 17: 984-92.

- 40- Fonsatti E, Sigalotti L, Arslan P, Altomonte M, Maio M. Emerging role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies. *Curr Cancer Drug Targets*.2003; 3: 427-32.
- 41- Ding S, Li C, Lin SM, Yang Y, Liu D, Han Y, et al. Comparative evaluation of microvessel density determined by CD34 or CD105 in benign and malignant gastric lesion. *Human Pathol*.2006; 37:861-6.
- 42- Li C, Guo B, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, et al. Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer*. 2000; 89:122-6.
- 43- Li C, Gardy R, Seon BK, et al. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis. *British J Cancer*. 2003;88:1424-31.
- 44- Saad RS, Lui YL, Nathan G, Celebrezze J, Medich D, Silverman JF. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2004;17:197-203.
- 45- Postiglione L, Di Domenico G, Caraglia M, et al. Differential expression and cytoplasm/membrane distribution of endoglin (CD105) in human tumour cell lines: implications in the modulation of cell proliferation. *Int J Oncol*. 2005; 26:193-201.
- 46- Nico B, Vincenzo B, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol*. 2008;23:601-7.
- 47- Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density. What it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94: 883-93.
- 48- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*. 1996;32A:2472-84.

- 49- Bianchini F, Massi D, Marconi C, et al. Expression of cyclo-oxygenase-2 in macrophages associated with cutaneous melanoma at different stages of progression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;83: 320–8.
- 50- Hinz B, Brune K. Analysis of COX-2 expression during malignant melanoma progression - cyclooxygenase-2 10 years later. *J. Pharmacol. Exp Ther.* 2002; 300:367-75.
- 51- Denkert C, Köbel M, Berger S, et al. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 2001; 61:303–8.
- 52- Sutton KM, Wright M, Fondren G, Towle CA, Mankin HJ. Cyclooxygenase-2 expression in chondrosarcoma. *Oncology.* 2004;66:275-80.
- 53- Endo M, Matsumura T, Yamaguchi T, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression is associated with a poor prognosis in chondrosarcomas. *Hum Pathol.* 2006; 37:471-6.
- 54- Schrage YM, Machado I, Meijer D, et al. COX-2 expression in chondrosarcoma: a role for celecoxib treatment? *Eur J Cancer.* 2010;46:616-24.
- 55- Liu JF, Fong YC, Chang CS, et al. Cyclooxygenase-2 enhances alpha2beta1 integrin expression and cell migration via EP1 dependent signaling pathway in human chondrosarcoma cells. *Mol Cancer.* 2010;9:43.
- 56- Nakagawa SA, Lopes A, Lopes de Carvalho A, et al. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, nitrotyrosine, and angiogenesis in chondrosarcoma and their relation to prognosis. *Bone Joint Surg Am.* 2010;92:1738-46.
- 57- Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O, et al. Overexpression of COX-2 in human osteosarcoma cells decreases proliferation and increases apoptosis. *Cancer Res.* 2006;66:6657-64.
- 58- Dickens DS, Kozielski R, Leavey PJ, Timmons C, Cripe TP. Cyclooxygenase-2 expression does not correlate with outcome in osteosarcoma or rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25:282-5.

- 59- Masi L, Recenti R, Silvestri S, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in osteosarcoma of bone. *Immunohistochem Mol Morphol*. 2007;15:70-6.
- 60- Liao Y, Li F, Hu X. Expression and clinical significance of OPN and COX-2 in osteosarcoma. *Chin Ger J Clin Oncol*. 2007;6:378-82.
- 61- Hillen F, Griffioen AW. Tumor vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26:489-502.
- 62- Etchebehere M, de Camargo OP, Croci AT, Oliveira CR, Baptista AM. Relationship between surgical procedure and outcome for patients with grade I chondrosarcomas. *Clinics*. 2005;60:121-6.
- 63- Donati D, Colangelis S, Colangeli M, DiBella C, Bertoni F. Surgical treatment of grade I central chondrosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468:581-9.
- 64- Riedel RF, Larrier N, Dodd L, Kirsch D, Martinez S, Brigman BE. The clinical management of chondrosarcoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2009;1:94-106.
- 65- Hansen S, Sørensen FB, Vach W, Grabau DA, Bak M, Rose C. Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients. *Histopathology*. 2004;44:428-36.
- 66- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*. 1996;32A:2474-84.
- 67- Fox SB, Harris AL. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS*. 2004;112:413-30.
- 68- Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology*. 2005.46:481-9.

- 69- Pannarale L, Morini S, D'Ubaldo E, Gaudino E, Marinozzi G. SEM corrosion-casts study of the microcirculation of the flat bones in the rat. *Anat Rec.* 1997;247:462-71.
- 70- Stepanova EV, Kharatishvili TK, Lichnitser MR, Baryshnikov A, Soloy'ev L, Trapeznikov NN. Prognostic significance of p53, HER-2/neu, Ki-67 and VEGF expression in chondrosarcomas. *Arkh Patol.* 2002;64:9-12.
- 71- Min BS, Kim NK, Jeong HC, Chung HC. High levels of serum VEGF and TIMP-1 are correlated with colon cancer liver metastasis and intrahepatic recurrence after liver resection. *Oncol Lett.* 2012;4:123-30.
- 72- Geza ACs, Paragh G, Rakosy Z, Laronga C, Zhang PJ. The extent of retraction clefts correlates with lymphatic vessel density and VEGF-C expression and predicts nodal metastasis and poor prognosis in early-stage breast carcinoma. *ModernPathology.* 2012;25:163-77.
- 73- Zhao YC, Ni XJ, Li Y, Dai M, Yuan ZX, Luo CY. Peritumoral lymphangiogenesis induced by vascular endothelial growth factor C and D promotes lymph node metastasis in breast cancer patients. *World J Sug Oncol.* 2012;20:165.
- 74- Maae E, Olsen DA, Steffensen KD, et al. Prognostic impact of placenta growth factor and vascular endothelial growth factor A in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133:257-65.
- 75- Lamml J, Fan M, Rosenthal HG, et al. Expression of vascular endothelial growth factor correlates with the advance of clinical osteosarcoma. *Int Orthop.* 2012: 2
- 76- Qu JT, Wang M, He HL, Tang Y, Ye XJ. The prognostic value of elevated vascular endothelial factor in patients with osteosarcoma: a meta-analysis and systemic review. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138:819-25.

77- Cintra FF, Cassone AE, Gonçalves JCB, Etchebehere M, Amstalden EMI. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in cartilaginous tumors. *Histopathology*. 2010;57:20.

78- Luque A, Slevin M, Turu MM, Juan-Babot O, Badimon L, Krupinski J. CD105 positive neovessels are prevalent in early stage carotid lesions, and correlate with the grade in more advanced carotid and coronary plaques. *J Angiogenes Res*. 2009; 1:6-16.

79- Manor E, Kachko L, Puterman MB, Szabo G, Bodner L. Cystic lesions of the jaws - a clinicopathological study of 322 cases and review of the literature. *J Med Sci*. 2006; 9:20-6.

80- Yamamoto FP. Estudo da presença de osteonecrose na mandíbula após exodontia de molares em ratos tratados com alendronato de sódio [Tese - Doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2010.



8- ANEXO



CEP, 25/11/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 927/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0735.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ANÁLISE DE FATORES ANGIOGÊNICOS E DA EXPRESSÃO DA COX-2 EM TUMORES DE LINHAGEM CARTILAGINOSA: CORRELAÇÃO CLÍNICO-HISTOLÓGICA".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Francisco Fontes Cintra

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/11/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 25/11/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Estudar e correlacionar os achados clínicos, radiológicos e histológicos de tumores ósseos com diferenciação cartilaginosa, bem como o valor de marcadores imuno-histoquímicos no diagnóstico diferencial destes tumores e na estimativa do prognóstico dos pacientes com a: 1) avaliação da micro densidade vascular, pela expressão de CD34 e CD105; 2) avaliação da expressão de VEGF; 3) avaliação da expressão da enzima COX-2.

III - SUMÁRIO

Serão resgatados dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas - UNICAMP, todos os blocos de parafina relativos à biópsias (incisional e excisional) de tumores ósseos de linhagem cartilaginosa. Os espécimes com material suficiente para novos cortes serão cortados e corados por métodos de rotina e colorações especiais, para exame histológico e gradação e tratados pelo método imuno-histoquímico com o uso dos seguintes anticorpos: anti-CD34, anti-CD105, anti-VEGF e anti-COX-2. Será utilizado o método Chalkey para estimativa da densidade média vascular. A expressão da COX-2 será avaliada em imagens digitais, com auxílio do programa Imagemlab, para quantificação relativa aleatória, cega, das células imuno-marcadas. Das observações clínicas arquivadas no SAM serão extraídas as seguintes informações: idade do paciente, tamanho do tumor, aspectos radiológicos, estágio à apresentação, recidiva local/metástase e tempo de acompanhamento até a data de corte ou até a perda de seguimento/óbito. Este estudo poderá contribuir para esclarecimento do processo de progressão de tumores cartilagosos bem como subsidiar o diagnóstico histológico dos tumores malignos de baixo grau.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto bem elaborado, exequível, respeitando os aspectos éticos envolvidos no tipo de estudo, com a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apropriado ao estudo.



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de novembro de 2008.

Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



9- APÊNDICE

CLINICAL SCIENCE

Analysis of angiogenic factors and cyclooxygenase-2 expression in cartilaginous tumors – clinical and histological correlation

Francisco Fontes Cintra,^{I,II} Mauricio Etchebehere,^{III} José Carlos Barbi Gonçalves,^V Alejandro Enzo Cassone,^{IV} Eliane Maria Ingrid Amstalden^I

^IPathology Department, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, Brazil. ^{II}Orthopedics Department, Casa de Saúde Campinas, Campinas/SP, Brazil. ^{III}Orthopedics Department; UNICAMP, Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, Brazil. ^{IV}Oncological Orthopedics Unit, Department of Orthopedics, Domingos Boldrini Children's Cancer Center, Campinas/SP, Brazil. ^VOrthopedics Department, Centro Médico de Campinas, Campinas/SP, Brazil.

OBJECTIVES: To study the role of angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression in cartilaginous tumors and correlate these factors with prognosis.

INTRODUCTION: For chondrosarcoma, the histological grade is the current standard for predicting tumor outcome. However, a low-grade chondrosarcoma can follow an aggressive course—as monitored by sequential imaging techniques—even when it is histologically indistinguishable from an enchondroma. Therefore, additional tools are needed to help identify the biological potential of these tumors. The degree of angiogenesis that is induced by the tumor could assist in this task. Angiogenesis can be quantified by measuring the expression of vascular endothelial growth factor and CD34, and cyclooxygenase-2 can induce angiogenesis by stimulating the production of pro-angiogenic factors.

METHODS: In total, 21 enchondromas and 58 conventional chondrosarcomas were studied by examining the clinical and histopathological findings in conjunction with the immunostaining markers of angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression.

RESULTS: The significant variables that were associated with poor outcome were 1) higher-grade chondrosarcomas, 2) tumors that developed in flat bones, and 3) over-expression of CD34 (with a median count that was higher than 5.9 vessels in 5 high power fields). Moreover, CD34 expression (measured using the Chalkley method) revealed significantly higher microvessel density in flat bone chondrosarcomas.

DISCUSSION: Previous studies have shown a positive correlation between Chalkley microvessel density and histological grade; however, in our sample, we found that the former is predictive of the outcome. Chondrosarcomas in flat bones have been shown to correlate with a poor prognosis. We also found that CD34 microvessel density values were significantly higher in flat-bone chondrosarcomas. This could explain—at least in part—the more aggressive biological course that is taken by these tumors.

CONCLUSIONS: These results provide evidence that CD34 microvessel density in chondrosarcomas can be helpful in predicting patient outcome and may add to our understanding of chondrosarcoma pathogenesis.

KEYWORDS: Histological grades; Flat bones; CD34; VEGF; Prognosis.

Cintra FF, Etchebehere M, Gonçalves JCB, Cassone AE, Amstalden EMI. Analysis of angiogenic factors and cyclooxygenase-2 expression in cartilaginous tumors – clinical and histological correlation. *Clinics*. 2011;66(9):1591-1596.

Received for publication on April 24, 2011; First review completed on May 26, 2011; Accepted for publication on June 1, 2011

E-mail: ingrid@fcm.unicamp.br

Tel.: 55 19 32893897

INTRODUCTION

Among bone tumors, cartilage-producing tumors rank as the third most frequent type, representing 30% of benign

tumors and 10–20% of malignant tumors.^{1,2} The World Health Organization (WHO) Classification of Bone Tumors (2002), which is based on the histological grade of the tumor, has been accepted as the standard for predicting tumor outcome.^{3,4} The histological grading system for chondrosarcomas (CSs) categorizes these tumors into three grades that are based on cellularity, nuclear atypia, and pleomorphism.⁴ Low-grade CSs tend to grow slowly and are associated with a 90% five-year survival rate but can recur and metastasize. In contrast, high-grade tumors have a

Copyright © 2011 CLINICS – This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

higher incidence of metastasis and a 45% five-year survival rate.³⁻⁶ In some borderline tumors (i.e., a grade 1 CS), distinguishing a CS from an enchondroma (EC) may be difficult when using only a routine histopathological examination, as the current diagnostic criteria are not definitive. Furthermore, these tumors have a broad array of clinical, radiographic, and histological presentations that cause difficulties in both diagnosis and treatment.³⁻⁷ Thus, it is important to establish additional tools that could help predict a tumor's biological potential. The degree of angiogenesis that the tumor elicits might assist in making this distinction.

Angiogenesis is a fundamental step in both neoplastic transformation and the regulation of tumor growth, as demonstrated by Folkman⁸ and Dvorak et al.⁹ The interaction of vessels with cartilaginous tissue is not a physiological step, except during skeletal development. For example, in enchondral ossification (the period in which the growth plate is active), vessels can be seen penetrating the zones of hypertrophied cartilage during matrix ossification.^{10,11} However, normal adult cartilage is avascular. Thus, the presence of vessels within cartilaginous tissue is associated with pathological conditions, such as osteoarthritis and tumors.^{10,11} Angiogenesis (or neoangiogenesis) can be quantified by measuring the expression of certain molecules.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most important angiogenic factors that have been described. Among its many functions are the formation, organization, and migration of blood vessels. VEGF also promotes the degradation of soft tissues around the sprouting endothelium and increases the permeability of venules. An increase in VEGF staining has been described in many epithelial, germ cell, lymphoid, melanocytic, and mesenchymal tumors.¹²⁻¹⁶

CD34 is a surface glycoprophosphoprotein that is expressed in small-vessel endothelial cells and is associated with angiogenesis.¹⁶⁻²⁰

Cyclooxygenases (COXs) are enzymes that catalyze the synthesis of prostaglandins from arachidonic acid. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is associated with inflammatory and mitogenic stimuli, resulting in increased prostaglandin synthesis in both inflamed and neoplastic tissues.²¹⁻²³ COX-2 also plays an important role in carcinogenesis, as it can induce angiogenesis by stimulating the production of pro-angiogenic factors, such as VEGF;²¹⁻²³ in addition, COX-2 can inhibit tumor cell apoptosis and immune surveillance, thus increasing the tumor's invasive and metastatic potential.^{21-23,25} Indeed, recent studies of various human tumors showed that COX-2 over-expression is associated with poor prognosis.²¹ In musculoskeletal tumors (e.g., osteosarcomas, rhabdomyosarcomas, and CSs), studies of COX-2 over-expression have yielded conflicting results.²¹⁻²⁹

In fact, neovascularization is only one of the many elements involved in neoplastic transformation and the progression of a tumor to a higher histological grade. However, because inhibiting angiogenesis is so important in the preservation of intact cartilage (as seen in the osteoarthritis therapeutic approach),^{10,11,15,16} it is possible that the lack of this inhibition is a significant component in the pathogenesis of cartilage tumors.

The present report is a retrospective study of 21 ECs and 58 conventional CSs, in which we addressed the clinical and follow-up data and histopathological findings with regard to immunostaining for markers of angiogenesis and COX-2

expression. The aim of this study was to evaluate the value of these findings as a prognostic tool in CSs and as a possible aid in the differential diagnosis between an ECs and a low-grade CSs.

MATERIALS AND METHODS

Patients and tumor samples

From 1988 through 2007, 141 patients with a primary EC or CS were admitted to the University Hospital – Unicamp (Campinas-Brazil) and Centro Médico de Campinas (Brazil). The tumor specimens were routinely fixed in 10% formalin and later decalcified with hydrochloric acid and ethylenediaminetetraacetic acid. The embedded tumor tissue from each patient was obtained from the Department of Pathology. The clinical, radiographic, and follow-up information were obtained from the patients' medical records. The routine staining of the tumor sections was reviewed to confirm the diagnosis. The histological grade (on a scale of 1 to 3) of each CS was determined based on nuclear size and staining (hyperchromasia) and cellularity according to the WHO Classification of Bone Tumors (2002).¹

Pathological material with insufficient tissue samples for new cuts or in poor fixative condition (n=54) and chondrosarcoma variants (mesenchymal: n=4; de-differentiated: n=2; clear cell: n=2), were excluded from the analysis. Therefore, a total of 79 patients (30 men and 49 women, ranging from 5 to 87 years of age, with a median age of 42 years) entered the study. There was no loss of follow-up data. The patient data are summarized in Table 1.

Twenty-one ECs that developed in the long (n=5) and short bones (n=16) were studied. Among the CSs were 31 grade 1 CSs that developed in the long (n=23) and flat bones (n=8). Twenty-four grade 2 CSs developed in the long (n=18) and flat bones (n=6), and 3 grade 3 CSs developed in the long (n=1) and flat bones (n=2). With the goal of correlating the clinical and histological results, the patients were divided into the following three groups: group I (n=21) comprised the patients with an EC; group II (n=31) comprised the patients with a grade 1 CS; and group III (n=27) comprised the patients with a grade 2 or 3 CS.

Because flat-bone CSs are associated with poor prognosis,¹ the benign and malignant tumor anatomical sites were also divided into three groups. Seventeen tumors (16 ECs and 1 high-grade CS) developed in small bones (metacarpal bone, n=11; hand phalanx, n=4; metatarsal bone, n=1; calcaneus, n=1). Forty-eight tumors (5 ECs and 43 CSs) developed in long bones (femur, n=18; fibula, n=3; tibia, n=10; humerus, n=13; radius, n=3; lumbar vertebra, n=1). Fourteen tumors (all CSs) developed in flat bones (ribs, n=6; scapula, n=2; pelvis, n=6).

All of the ECs (n=21) were treated with curettage. The CSs were removed by either wide resection or amputation, with a wide margin in 12 cases, a marginal resection in 26 cases, and an intralesional resection or curettage in 18 cases (all 18 of which were grade 1 CS cases).³⁰ Instead of surgery, two extremely large pelvic tumors (in the sacrum and iliac bone) were treated using chemotherapy and/or radiotherapy after establishing the diagnosis by biopsy. Four of the patients underwent chemo/radiotherapy for local recurrence and metastasis after undergoing a marginal resection. Chondrosarcoma size and the adequacy of the

Table 1 - Correlation between variables in groups I, II, and III.

| | Group I (n = 21 ECs) | Group II (n = 31 Low-Grade CSs) | Group III (n = 27 Moderate/High- Grade CSs) |
|-------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---|
| Gender | | | |
| Male | 7 (33.33%) | 13 (41.93%) | 10 (37.03%) |
| Female | 14 (66.67%) | 18 (58.07%) | 17 (62.97%) |
| Mean age at Dx (years) | 29.6 | 43 | 50 |
| Follow-up (months) | 98 | 66 | 71 |
| Site | | | |
| Small bone | 16 (76.2%) | 0 | 1 (3.7%) |
| Long bone | 5 (23.8%) | 23 (74.20%) | 20 (74.1%) |
| Flat bone | 0 | 8 (25.8%) | 6 (22.22) |
| COX-2 | | | |
| No expression | 2 (9.5%) | 20 (64.5%) | 15 (55.56%) |
| <10% | 9 (42.9%) | 7 (22.6%) | 6 (22.22) |
| 10-50% | 8 (38.1%) | 4 (12.9%) | 3 (11.11%) |
| >50% | 2 (9.5%) | 0 | 3 (11.11%) |
| VEGF | | | |
| ≤10.5% | 11 (52.38%) | 17 (54.84%) | 14 (51.85%) |
| >10.5% | 10 (47.69%) | 14 (45.16%) | 13 (48.15%) |
| CD34 | | | |
| ≤5.9 | 21 (100%) | 27 (87%) | 20 (74.1%) |
| >5.9 | 0 | 4 (13%) | 7 (25.9%) |
| Outcome | 100% cured | 3 (9.6%) poor | 11 (40.7%) poor |

Dx: diagnosis; ECs: enchondromas; CSs: chondrosarcomas; Mod: moderate.

surgical margins were excluded from analysis, as 18 of the 58 CS patients were treated with curettage.

The follow-up interval was recorded from the time of the surgery until January 2009. The minimum follow-up period was 24 months (or shorter in cases of death), and the median follow-up was 77 months (with a range of 4-250 months).

Immunohistochemical technique

The primary antibodies that were used included anti-CD34 (Mo a Hu CD34 Class II, Clone QBEnd 10, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) at a dilution of 1:50, anti-VEGF (A-20 rabbit polyclonal IgG, 200 µg/ml, Santa Cruz Biotech., Inc, Santa Cruz, CA, USA) at a dilution of 1:200, and anti-COX-2 (Cyclooxygenase-2 antibody clone-4h12, Diagnostic Byosystem, Pleasanton, CA, USA) at a dilution of 1:50. Epitope retrieval was achieved by steaming with citrate buffer (at 95°C). The EnVision + Dual Link System HRP polymer (Dako) was used as a reaction amplifier. The antibody complex was visualized with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) staining according to the manufacturer's instructions. The sections were counterstained with Mayer hematoxylin. The appropriate negative and positive controls were included in each assay.

Immunohistochemical analysis

All of the immunostained sections were evaluated simultaneously (using a double-headed microscope) by two investigators (EMIA and FFC) who were unaware of the clinical status of the patient being studied.

With regard to COX-2, a consensus judgment was adopted as the proper tumor immunohistochemical score according to the method of Endo et al.,²² with adaptations characterized by the mean of the proportion of stained tumor cells in 5 "hot-spot" high-power fields (at 400x magnification) as follows: 0 = no stained tumor cells; 1+ =

less than 10% of all tumor cells stained; 2+ = 10-50% of all tumor cells stained; and 3+ = more than 50% of all tumor cells stained.

For VEGF, cellularity was quantified by counting the relative number of immunostained cells per 5 "hot-spot" high-power fields (HPFs) (at 400x magnification) and was expressed as a percentage of the total number of neoplastic cells according to the method of Ayala et al.¹²

For the CD34 analysis, the sections were scanned using a low-power view (at 50x magnification). Five areas displaying the highest number of immunostained microvessels (i.e., hot-spots) were identified.^{17,18} Next, one 400x microscopic field (corresponding to an area of 0.1449 mm²) was chosen within each hot-spot. A 25-point Chalkley eyepiece graticule (Leitz Orthoplan, Leica) was applied to each selected hot-spot field (corresponding to a Chalkley grid area of 0.041 mm²). The graticule was positioned such that the immunostained vessels hit the maximum number of points. The final Chalkley count for an individual tumor was taken as the mean value of the five graticule counts. The generally accepted criteria for determining a vessel's profile^{17,18} were followed and included any stained endothelial cells or endothelial cell clusters that were separated from the adjacent microvessels. A visible lumen was not a requirement for a structure to be counted as a microvessel. Necrotic or sclerotic areas within the tumor and non-tumor areas that were adjacent to the tumor were excluded from the vessel counts.³¹⁻³³

Statistical analysis

Chi-squared or Fisher's tests were used to compare outcome, gender, site, follow-up span, and COX-2 expression. For the VEGF and CD34 results, Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test or analysis of variance (ANOVA) with transformation by ranks was used, followed by Tukey's test to identify differences when necessary. To test the linear association between two immunomarkers, the Spearman correlation coefficient was determined. A multiple logistic regression analysis (the generalized log model) was used to identify factors that differentiate the histological grade of the tumor. The process of selecting the variables that were used was stepwise. The level of significance for the statistical tests was set at $p < 0.05$. The data analysis was performed using the SAS System for Windows version 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTS

The results are summarized in Tables 1 and 2.

The following 14 patients had poor outcomes: three in group II (metastasis: n=1; local recurrence: n=2) and 11 in group III (local recurrence: n=4; death: n=7). None of the ECs recurred. None of the patients whose CS was treated with curettage presented a tumor recurrence or poor outcome.

There were no significant differences among the three groups with regard to the duration of follow-up ($p = 0.7431$). A poor outcome was significantly associated with the following: 1) moderate/high-grade CS ($p < 0.0001$); 2) tumors that developed in a flat bone ($p < 0.0001$); and 3) over-expression ($p < 0.02$) of CD34 (when the number of immunostained vessels was higher than the median of 5.9 vessels in 5 high-power fields) (Figures 1A and B). No significant correlations were found between outcome and age

Table 2 - Correlation between variables in groups II (grade I CSs) and III (high-grade CSs).

| Outcome | Good (n = 44) | Poor (n = 14) | p-value |
|---------------------------|---------------|---------------|----------|
| Gender | | | 0.7293* |
| Male | 18 (40.1%) | 5 (35.7%) | |
| Female | 26 (39.9%) | 9 (64.3%) | |
| Age (years) | | | 0.1966* |
| ≤51 | 28 (63.6%) | 7 (50%) | |
| >51 | 16 (36.4%) | 7 (50%) | |
| Histological Grade | | | <0.0001* |
| Grade 1 | 28 (63.6%) | 3 (21.4%) | |
| Grade 2 or 3 | 16 (36.4%) | 11 (78.6%) | |
| Site | | | <0.0001* |
| small bone | 1 (2.3%) | 0 | |
| long bone | 36 (81.8%) | 7 (50%) | |
| flat bone | 7 (15.9%) | 7 (50%) | |
| CD34 MVD | | | 0.0104‡ |
| ≤5.9 | 37 (84%) | 7 (50%) | |
| >5.9 | 7 (16%) | 7 (50%) | |
| COX-2 | | | 0.3364* |
| no expression | 28 (63.6%) | 7 (50%) | |
| <10% | 10 (22.7%) | 3 (21.4%) | |
| 10-50% | 5 (11.3%) | 2 (14.3%) | |
| >50% | 1 (2.4%) | 2 (14.3%) | |
| VEGF expression | | | 0.2094‡ |
| ≤10.5% | 22 (50%) | 9 (64.3%) | |
| >10.5% | 22 (50%) | 5 (35.7%) | |

*- Fischer test.

‡ - Mann-Whitney and ANOVA test.

($p=0.1966$), gender ($p=0.7293$), COX-2 expression ($p=0.3364$), or VEGF expression ($p=0.2094$). An over-expression of VEGF (when the percentage of immunostained cells was higher than the median of 10.5% in five high-power fields) was found in 48% of low-grade CSs (group II) and in 59% of moderate/high-grade CSs (group III).

None of the variables proved useful for differentiating between low-grade CSs and ECS ($p=0.7152$).

A multivariate analysis of CD34 immunostaining (using Mann-Whitney, ANOVA, and Tukey's tests) revealed a positive association between higher microvessel density (MVD) and flat bone sites ($p<0.01$). Indeed, flat bone CSs (Figure 1B) had a mean of 6.1 CD34-positive vessels in the Chalkley count compared with 4.7 and 4.6 CD34-positive vessels in the long and small bones, respectively.

Although COX-2 expression was not correlated with patient outcome, its over-expression (Figure 1C) (more than 10% positive COX-2 cells in five high-power fields) was positively correlated ($p<0.02$) with increased CD34-positive MVD (using an ANOVA test followed by the Kruskal-Wallis test). Among the EC cases, we found that 19/21 (90%) of the tumors stained positively for COX-2 (Fig. 1D). In 10 of the 21 ECs (47%), an over-expression (i.e., >10% of positive cells) was found; VEGF over-expression was found in 13 (61%) of the ECs. Intra-tumoral CD34-positive vessels were found in 100% of the ECs but displayed weak CD34 expression (none had a Chalkley count above 5.5).

DISCUSSION

Histological grading of CSs is considered to be the most useful predictor of outcome,^{1,3,4} but this is a subjective procedure, and the current criteria are not definitive.^{5,6} Therefore, supplemental methods for assessing the

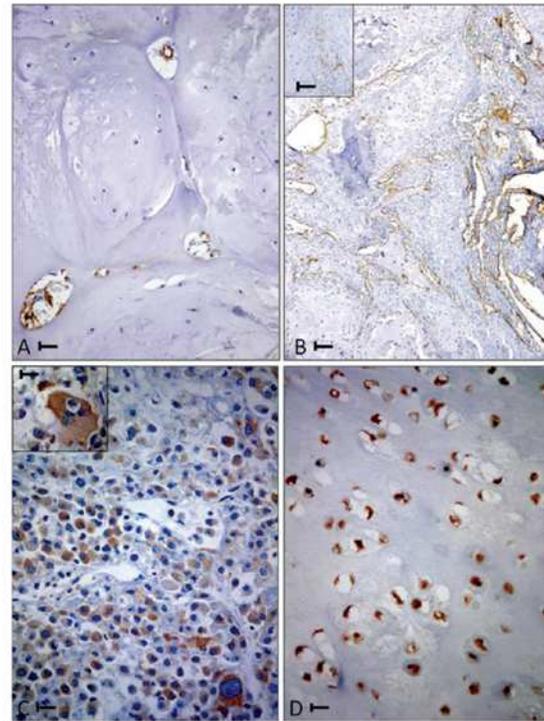


Figure 1 - (A) A grade I femur chondrosarcoma (CS) with low CD34 microvascular density (CD34 positive MVD). Bar = 0.02 mm. **(B)** A grade II iliac bone CS with high CD34 positive MVD. Bar = 0.04 mm. A magnified view is shown in the inset (bar = 0.02 mm). **(C)** A grade 3 humerus CS. Bar=0.02 mm. Bizarre cells are shown in the inset (bar = 0.01 mm) with diffuse strong immunoreactivity to COX-2 antibody. **(D)** A hand phalanx enchondroma with uniform and diffuse immunoreactivity to COX-2 antibody. Bar = 0.02 mm.

prognosis of CS patients have been sought and include the evaluation of DNA synthesis and content; flow cytometry using molecular markers, such as p53 and MIB-1; cytogenetic features; histomorphometry; and radiographic classifications. Nevertheless, none of these methods is considered to be definitive.^{1,3-7}

The present study provides immunohistochemical evidence that MVD—as evaluated by CD34 staining—is significantly associated with poor prognosis. Our results differ from those of Nakagawa et al.,²⁵ who found no correlation between CD34 expression and outcome. The two additional predictive variables that we identified (i.e., histological grade and tumor site in flat bones) are well known in the medical literature.^{1,4,5} However, in our study, we also found that CD34 positive MVD was significantly higher in flat bone CSs. In animal experiments, flat and long bones had the same density of vessels.³⁴ However, in adults, flat bones have functional bone marrow that contains stem cells and produces many growth factors¹⁶ that could elicit tumor angiogenesis.

The role of COX-2 in cartilage tumors is controversial. Endo et al. in 2006 and Schrage et al. in 2010^{22,23} have reported that COX-2 over-expression is associated with poor

prognosis in CSs. Our results are in line with those of Sutton et al.,²¹ who studied 32 cartilaginous tumors by Western blot analysis and found no statistical correlation between the expression of COX-2 and the following variables: age, sex, stage, anatomical site, metastasis development, or survival rate. In addition, Nakagawa et al.²⁵ studied 101 CS specimens and found no correlation between COX-2 expression and prognosis. We previously studied 53 CSs (seven of which were unconventional and included four mesenchymal, two de-differentiated and one clear-cell).³⁵ In the previous sample, we found that a COX-2 expression frequency above 50% was associated with poor prognosis; all of the six patients with either mesenchymal or de-differentiated CSs died within 24 months of their diagnosis. In the present study, we added 12 additional conventional CS patients and excluded the unconventional tumors from the sample and found no significant correlation between COX-2 expression and outcome. Another difference between our findings and those of Endo et al.²² was that they did not find any COX-2 staining in enchondromas, whereas 90% of our enchondroma specimens had positive COX-2 staining.

Contradictory results have also been obtained from studying other bone tumors, such as osteosarcomas. Xu et al.²⁶ found that COX-2 over-expression was associated with a better prognosis. In contrast, Dinckens et al.²⁷ found no correlation between COX-2 over-expression and patient outcome. Finally, Masi et al.²⁸ and Liao et al.²⁹ reported that cases of osteosarcoma had worse prognosis and decreased patient survival rates whether COX-2 was overexpressed. We suggest the following two reasons for these discordant results: 1) the COX-2 antibody clone that we used was different from that used by Endo et al.; and/or 2) any problems with the fixation or decalcification of the samples could have biased the results. Nevertheless, we found a positive correlation between CD34 positive MVD and COX-2 expression, which is in line with the well-known relationship between COX-2 and angiogenesis. Therefore, this enzyme might have at least an indirect role in patient prognosis.

With respect to VEGF expression, our quantitative results are similar to those of Ayala et al.¹² and Kalinski et al.,^{13,14} which were descriptive studies that found a higher rate of VEGF expression in moderate- and high-grade CSs. In our sample, no significant correlation was observed between VEGF expression and outcome.

CONCLUSIONS

Chalkley MVD—as evaluated through CD34 antibody expression—may be a useful tool to help predict patient outcome in chondrosarcoma (CS) cases. These data can be considered for selective therapeutic inhibitory targeting. The higher MVD in flat bone CSs could explain the poorer outcome of these tumors relative to long/short bone CSs. None of the variables that were examined in this study were found to be useful in distinguishing a low-grade chondrosarcoma from an enchondroma.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Ana Cláudia S. Piazza and Luzia A. M. Reis for technical assistance, Cleide Ap. M. Silva and Helymar C. Machado for assistance with the statistical analyses, Adilson A. Piazza for assistance with photographic documentation and Ms. Diane Ellis, for her assistance with

English grammar. This study was supported by FAPESP [grant number 09/51473-0].

REFERENCES

- Dorfman HD, Czerniak B. Bone cancers. *Cancer*. 1995;75:203-10, doi: 10.1002/1097-0142(19950101)75:1+<203::AID-CNCR2820751308>3.0.CO;2-V.
- Terek RM. Angiogenesis in chondrosarcoma. *Curr Opin Orthop*. 2002;13:449-53, doi: 10.1097/00001433-200212000-00012.
- Chow WA. Update on chondrosarcomas. *Curr Opin Oncol*. 2007;19:371-6, doi: 10.1097/CCO.0b013e32812143d9.
- Amstalden EMI. Tumores do sistema osteoarticular. In: Billis A, Vassallo J, editors. *Patologia diagnóstica de tumores*. 2nd ed. Campinas. Imprensa Digital do Brasil Gráfica e Editora. 2004;345-52.
- Galant C, Malghem J, Sibille C, Docquier PL, Delloye C. Current limitations to the histopathological diagnosis of some frequently encountered bone tumours. *Acta Orthop Belg*. 2008;74:1-6.
- Wang XL, De Beuckeleer LH, De Schepper AM, Van Marck E. Low-grade chondrosarcoma vs enchondroma: challenges in diagnosis and management. *Eur Radio*. 2001;11:1054-7, doi: 10.1007/s003000000651.
- Ollivier L, Vanel D, Leclère J. Imaging of chondrosarcomas. *Cancer Imaging*. 2003;4:36-8, doi: 10.1102/1470-7330.2003.0022.
- Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res*. 1985;43:175-203, doi: 10.1016/S0065-230X(08)60946-X.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995;146:1029-39.
- McGough R, Aswad B, Terek RM. Pathologic neovascularization in cartilage tumors. *Clin Orthop*. 2002;397:76-82, doi: 10.1097/00003086-200204000-00011.
- Murata M, Yudoh K, Masuko K. The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16:279-86, doi: 10.1016/j.joca.2007.09.003.
- Ayala G, Liu C, Nicosia R, Horowitz S, Lackman R. Microvasculature and VEGF expression in cartilaginous tumors. *Hum Pathol*. 2000;31:341-6, doi: 10.1016/S0046-8177(00)80248-8.
- Kalinski T, Krueger S, Sel S, Werner K, Röpke M, Roessner A. Differential expression of VEGF-A and angiopoietins in cartilage tumors and regulation by interleukin-1 β . *Cancer*. 2006;106:2028-38, doi: 10.1002/cncr.21848.
- Kalinski T, Sel S, Kouznetsova I, Röpke M, Roessner A. Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in cartilage tumors. *Pathol Res Pract*. 2009;205:339-45, doi: 10.1016/j.prp.2008.12.008.
- Furumatsu T, Nishida K, Kawai A, Namba M, Inoue H, Ninomiya Y. Human chondrosarcoma secretes vascular endothelial growth factor to induce tumor angiogenesis and stores basic fibroblast growth factor for regulation of its own growth. *Int J Cancer*. 2002;97:313-22.
- McGough RL, Lin C, Meitner P, Aswad BI, Terek RM. Angiogenic cytokines in cartilage tumors. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;397:62-9, doi: 10.1097/00003086-200204000-00009.
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87:1-13.
- Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 1990;15:2417-26.
- Hansen S, Sørensen FB, Vach W, Grabau DA, Bak M, Rose C. Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients. *Histopathology*. 2004;44(5):428-36, doi: 10.1111/j.1365-2559.2004.01848.x.
- Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*. 1996;32A:2474-84, doi: 10.1016/S0959-8049(96)00379-6.
- Sutton KM, Wright M, Fondren G, Towle CA, Mankin HJ. Cyclooxygenase-2 expression in chondrosarcoma. *Oncology*. 2004;66:275-80, doi: 10.1159/000078327.
- Endo M, Matsumura T, Yamaguchi T, Yamaguchi U, Morimoto Y, Nakatani F, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression associated with a poor prognosis in chondrosarcomas. *Hum Pathol*. 2006;37:471-6, doi: 10.1016/j.jhumpath.2005.12.001.
- Schrage YM, Machado I, Meijer D, Briaire-de Bruijn J, van den Akker BE, Taminau AH, et al. COX-2 expression in chondrosarcoma: a role for celecoxib treatment? *Eur J Cancer*. 2010;46:616-24, doi: 10.1016/j.ejca.2009.11.002.
- Liu JF, Fong YC, Chang CS, Huang CY, Chen HT, Yang WH, et al. Cyclooxygenase-2 enhances alpha2beta1 integrin expression and cell migration via EPI dependent signaling pathway in human chondrosarcoma cells. *Mol Cancer*. 2010;9:43, doi: 10.1186/1476-4598-9-43.
- Nakagawa SA, Lopes A, Lopes de Carvalho A, Rossi BM, Werneck da Cunha I, Soares FA, et al. Nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, nitrotyrosine, and angiogenesis in chondrosarcoma and their relation

- to prognosis. *Bone Joint Surg Am.* 2010;92:1738-46, doi: 10.2106/JBJS.H.00717.
26. Xu Z, Choudhary S, Voznesensky O, Mehrotra M, Woodard M, Hansen M, et al. Overexpression of COX-2 in human osteosarcoma cells decreases proliferation and increases apoptosis. *Cancer Res.* 2006;66:6657-64, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3624.
 27. Dickens DS, Kozielski R, Leavey PJ, Timmons C, Cripe TP. Cyclooxygenase-2 expression does not correlate with outcome in osteosarcoma or rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25:282-5, doi: 10.1097/00043426-200304000-00003.
 28. Masi L, Recenti R, Silvestri S, Pinzani P, Pepi M, Paglierani M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in osteosarcoma of bone. *Immunohistochem Mol Morphol.* 2007;15:70-6, doi: 10.1097/01.pai.0000213131.63417.1a.
 29. Liao Y, Li F, Hu X. Expression and clinical significance of OPN and COX-2 in osteosarcoma. *Chin Ger J Clin Oncol.* 2007;6:378-82, doi: 10.1007/s10330-007-0004-9.
 30. Etchebehere M, de Camargo OP, Croci AT, Oliveira CR, Baptista AM. Relationship between surgical procedure and outcome for patients with grade I chondrosarcomas. *Clinics.* 2005;60:121-6, doi: 10.1590/S1807-59322005000200007.
 31. Fox SB, Harris AL. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *APMIS.* 2004;112:413-30, doi: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0803.x.
 32. Nico B, Benagiano V, Mangieri D, Maruotti N, Vacca A, Ribatti D. Evaluation of microvascular density in tumors: pro and contra. *Histol Histopathol.* 2008;23:601-7.
 33. Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology.* 2005;46:481-9, doi: 10.1111/j.1365-2559.2005.02142.x.
 34. Pannarale L, Morini S, D'Ubaldo E, Gaudino E, Marinozzi G. SEM corrosion-casts study of the microcirculation of the flat bones in the rat. *Anat Rec.* 1997;247:462-71, doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(199704)247:4<462::AID-AR4>3.0.CO;2-T.
 35. Cintra FF, Cassone AE, Gonçalves JCB, Etchebehere M, Amstalden EMI. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in cartilaginous tumors. *Histopathology.* 2010;57:20.