

**ESTUDO DAS EXPRESSÕES DAS SINTASES DO
ÓXIDO NÍTRICO, NITROTIROSINA,
CICLOOXIGENASE-2 E CD34; E SUAS RELAÇÕES
COM O PROGNÓSTICO NOS
PACIENTES PORTADORES DE CONDROSSARCOMA**

SUELY AKIKO NAKAGAWA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção de título de Mestre
em Ciências.**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

Co-Orientadores: Prof. Dr. Fernando A. Soares

Dr. Benedito Mauro Rossi

**São Paulo
2005**

FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE
Ana Méria Rodrigues Alves Kuninart
Diretora de Escola
RG. 6.080.136



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A. C. Camargo

Nakagawa, Suely Akiko

Estudo das expressões das sintases do óxido nítrico, nitrotirosina, ciclooxigenase-2 e CD34; e suas relações com o prognóstico nos pacientes portadores de condrossarcoma / Suely Akiko Nakagawa -- São Paulo, 2005.

72p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de Concentração:

Oncologia.

Orientador: Ademar Lopes

Descritores: 1. CONDIROSSARCOMA. 2. ÓXIDO NÍTRICO/análise. 3. SINTASE DE ÓXIDO NÍTRICO. 4. IMUNOHISTOQUÍMICA. 5. MARCADOR DE TUMOR. 6. ANTÍGENOS CD34. 7. CICLOOXIGENASE.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela orientação, e pelos exemplos de dedicação e amor incondicional.

Ao meu irmão Wilson, profissional competente e ser humano admirável.

Ao meu irmão Flávio, pelos exemplos de determinação e iniciativa.

À minha cunhada Jury, mulher de força e objetividade admiráveis.

Aos meus sobrinhos Vitor e Vinicius, pelas alegrias e exemplos de companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Prof. Dr. Ademar Lopes, meu orientador, pelos conhecimentos repassados e pelo importante papel no meu desenvolvimento científico e profissional.

Dr. Benedito Mauro Rossi, meu co-orientador, pelo constante apoio, valiosas orientações e conhecimentos repassados; e importante papel no meu desenvolvimento.

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, meu co-orientador, pelos auxílios e conhecimentos repassados.

Dra. Isabela Werneck da Cunha, pela dedicação e valiosa contribuição em todo o trabalho anatomopatológico.

Dr. André Lopes de Carvalho, pela imprescindível colaboração na análise estatística, pelos conhecimentos repassados e constante apoio.

Dr. Wu Tu Chung pelos ensinamentos, pelo importante papel no meu desenvolvimento profissional e pela amizade.

Sra. Suely Francisco Neves Epifanio, pela eficiente ajuda e competência.

Enfermeira Érika Maria Monteiro Santos, pela ajuda na montagem do banco de dados.

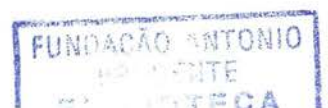
Sra. Hirde Contesini, pela dedicação e organização do Serviço de Arquivos Médicos do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

Sra. Suely Nonogaki pelo preparo das lâminas para o estudo imunoistoquímico.

Sr. José Ivanildo Neves pelos ensinamentos no preparo das lâminas de imunoistoquímica.

Aos demais companheiros do Departamento de Cirurgia Pélvica: Drs. Álvaro Sadek Sarkis, Fábio de Oliveira Ferreira, Francisco Paulo Fonseca, Gustavo Cardoso Guimarães, Lucíola Assunção Alves, Salim Zequi Garcia, Samuel Aguiar Júnior, Stênio de Cássio Zequi, Wilson Bachega Júnior, Wilson Toshihiko Nakagawa, pela amizade e apoio.

À FAPESP pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste projeto.



RESUMO

Nakagawa SA. Estudo das expressões das sintases do óxido nítrico, nitrotirosina, ciclooxigenase-2 e CD34; e suas relações com o prognóstico nos pacientes portadores de condrossarcoma. **São Paulo; 2005.** [Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O estudo imunoistoquímico dos tumores tem tido importância nos últimos anos para auxiliar no diagnóstico anatomopatológico, prever o prognóstico dos pacientes e mesmo para ajudar na escolha da terapêutica com base na expressão de determinados marcadores. O óxido nítrico (NO), a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a angiogênese têm sido relacionados com diversos tipos de tumores. O NO tem sido associado às neoplasias por suas ações pro e anti-tumorais, sendo a angiogênese um dos mecanismos pelos quais ele apresenta seu efeito pro-tumoral. Esse marcador tem sido estudado de forma indireta através de suas enzimas (sintases dos óxidos nítricos - NOS): NOS1, NOS2 e NOS3; e através de um de seus produtos, a nitrotirosina. A COX-2 que tem produção estimulada pelo NO, também tem sido associada a diversas neoplasias por sua ação angiogênica. O CD34 é uma glicoproteína transmembrana que tem sido utilizada como marcador vascular. Os objetivos deste trabalho foram avaliar as expressões desses marcadores, uma vez que têm sido pouco estudados nos condrossarcomas; e avaliar suas relações com o prognóstico desses pacientes. Foram analisados 101 pacientes portadores de condrossarcoma e seus respectivos blocos histológicos, através do método de *tissue microarray* para as

expressões de NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina e COX-2; e avaliado a microcirculação através da expressão de CD34. A análise estatística foi realizada com o uso do programa estatístico "SPSS 12.0 for Windows". Para análise das associações entre as expressões das NOS e nitrotirosina; entre NOS, nitrotirosina e COX-2; entre NOS, nitrotirosina, COX-2 e CD34; entre cada um dos marcadores e os graus histológicos foram utilizados o teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher quando necessário. A sobrevida livre de doença local, de doença metastática e global foram analisadas pelo método de Kaplan-Meier, e a comparação das curvas, pelo teste de Log-rank. Para a análise multivariada para as sobrevidas foi utilizado o modelo de regressão de Cox. Foram considerados valores estatisticamente significativos, quando p foi menor que 0,05. Este trabalho demonstra que os condrossarcomas expressam NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina, COX-2 e CD34. As expressões de NOS1, NOS2 e NOS3 estavam relacionadas com nitrotirosina ($p=0,039$; $p=0,045$ e $p<0,001$, respectivamente); e com COX-2 ($p=0,001$; $p<0,001$ e $p<0,001$, respectivamente). As expressões de NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina e COX-2 estavam relacionadas com a microcirculação ($p<0,001$; $p=0,003$; $p=0,006$; $p=0,002$ e $p=0,002$, respectivamente). A nitrotirosina, COX-2 e CD34 estavam relacionados com o grau histológico ($p=0,022$; $p=0,014$; $p=0,028$), porém não estavam associados com a sobrevida dos pacientes portadores de condrossarcomas. Por outro lado, as margens cirúrgicas e a expressão de NOS2 mostraram relação com menor sobrevida livre de doença local ($p=0,015$ e $p=0,038$, respectivamente); as expressões de NOS1 e NOS2 estavam relacionadas

com a sobrevida livre de doença metastática ($p=0,022$ e $p =0,017$, respectivamente); e a idade, status na admissão (doença loco-regional ou doença loco-regional e à distância), estadiamento de Enneking e as expressões para NOS1 e NOS2 estavam relacionadas com sobrevida global ($p=0,024$; $p<0,001$; $p<0,001$; $p=0,007$ e $p<0,001$, respectivamente). Na análise multivariada, as margens cirúrgicas e a expressão de NOS2 eram variáveis independentes relacionadas com a sobrevida livre de doença local; expressões de NOS1 e NOS2 eram variáveis dependentes em que a expressão conjunta de NOS1 e NOS2 apresentou relação com menor sobrevida livre de doença metastática ($p=0,013$), com $RR=7,8$; e a expressão independente ou conjunta de NOS1 e NOS2 apresentaram relação com menor sobrevida global ($p=0,046$ e $p=0,004$, respectivamente); com $RR=3,17$ e $RR=5,58$, respectivamente.

SUMMARY

Nakagawa SA. Analyses of nitric oxide synthases, nitrotyrosine, cyclooxygenase-2 and CD34; and their prognostic significances in chondrosarcomas. São Paulo; 2005. [Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Immunohistochemical study of tumors have been important to help histopathological diagnoses, to predict prognoses and to make therapeutic decisions, according to the expressions of biomarkers. Nitric oxide (NO), cyclooxygenase-2 (COX-2) and angiogenesis have been related to many tumors. NO has been associated to tumors because of its pro and anti-tumor effects, and angiogenesis is one of its pro-tumor action. This marker has been studied indirectly by the enzymes (nitric oxide synthase – NOS): NOS1, NOS2 and NOS3, which are responsible for NO production; and its product, the nitrotyrosine. NO can stimulate the production of COX-2, which has been related to many tumors because of its action to regulate angiogenesis. CD34 is a transmembrane protein which has been used as a microvessel marker. This study examines the expressions of these biomarkers, because they have been poorly studied in chondrosarcomas; and their relation to prognosis in these patients. One hundred one cases with chondrosarcomas were analyzed and histological studies were performed by tissue microarray method for NOS1, NOS2, NOS3, nitrotyrosine and COX-2 expressions. Microvessel analysis was performed according to CD34 expression.

Statistical analyses were made by "SPSS 12.0 for windows" program. The association between NOS and nitrotyrosine expression; between NOS, nitrotyrosine and COX-2; between NOS, nitrotyrosine, COX-2 and CD34; between each biomarker and histological grade were analyzed by Qui-square test or Fisher's exact test, where appropriate. The analysis of local and metastatic disease free survival and overall survival rates were made by Kaplan-Meir method and their curves were compared by Log-rank test. The multivariate analysis was performed by the Cox proportional hazards regression analysis. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. The present findings conclude that there are NOS1, NOS2, NOS3, nitrotyrosine and COX-2 expressions in chondrosarcomas. The expressions of NOS1, NOS2 and NOS3 were related to nitrotyrosine expression ($p=0,039$; $p=0,045$ and $p < 0,001$, respectively); and they were also related to COX-2 expressions ($p=0,001$; $p < 0,001$ and $p < 0,001$, respectively). The expressions of NOS1, NOS2, NOS3, nitrotyrosine and COX-2 were related to microvasculature ($p < 0,001$; $p=0,003$; $p=0,006$; $p=0,002$ and $p=0,002$, respectively). The nitrotyrosine, COX-2 and CD34 were also related to chondrosarcoma histological grades ($p=0,022$; $p=0,014$; $p=0,028$), but they were not associated to patient survivals. Otherwise, surgical margins and NOS2 expression were associated to worse local disease free survival ($p=0,015$ and $p=0,038$, respectively); the expressions of NOS1 and NOS2 were related to worse metastatic disease free survival ($p=0,022$ and $p=0,017$, respectively); and age, status at the admission (local disease or local and metastatic disease), the staging system adopted by Musculoskeletal Tumor

Society first described by Enneking and the expressions of NOS1 and NOS2 (isolated or combined) are related to overall survival rates. ($p=0,024$; $p<0,001$; $p<0,001$; $p=0,007$ e $p<0,001$, respectively). On multivariate analysis surgical margins and expression of NOS2 demonstrated independent prognostic impacts on local disease free survival; expressions of NOS1 and NOS2 were dependent variable, and the combined expressions of NOS1 and NOS2 were related to worse metastatic disease free survival ($p=0,013$), $HR=7,8$; and the isolated or combined expressions of NOS1 and NOS2 were related to worse overall survival rates ($p=0,046$ and $p=0,004$, respectively); with $HR=3,17$ e $HR=5,58$, respectively.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Expressão da NOS1 em condrossarcoma de grau III.	30
Figura 2	Expressão da NOS2 em condrossarcoma de grau II.	30
Figura 3	Expressão da NOS3 em condrossarcoma de grau II.	31
Figura 4	Expressão da nitrotirosina em condrossarcoma de grau II.	31
Figura 5	Expressão da COX-2 em condrossarcoma de grau III.	32
Figura 6	Expressão de CD34 em vasos intratumorais de condrossarcoma.	32
Figura 7	Expressões da (a) NOS1; (b) NOS2; (c) NOS3; (d) nitrotirosina e (e) COX-2 em amostras de cartilagem normal.	33
Figura 8	Curva atuarial de sobrevida livre de doença local para os pacientes portadores de condrossarcoma.	38
Figura 9	Curva atuarial de sobrevida livre de doença local para os pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com as margens cirúrgicas.	40
Figura 10	Curva atuarial de sobrevida livre de doença local para os pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a expressão de NOS2.	41
Figura 11	Curva atuarial de sobrevida livre de doença metastática para os pacientes portadores de condrossarcoma.	42
Figura 12	Curva atuarial de sobrevida livre de doença metastática para os pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a expressão de NOS1.	44

Figura 13	Curva atuarial de sobrevida livre de doença metastática para os pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a expressão de NOS2.	45
Figura 14	Curva atuarial de sobrevida global para os pacientes portadores de condrossarcoma.	46
Figura 15	Curva atuarial de sobrevida global para os pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a idade na admissão.	49
Figura 16	Curva atuarial de sobrevida global para os pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com o status na admissão.	50
Figura 17	Curva atuarial de sobrevida global para os pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com o estadiamento da Sociedade de Tumores Musculoesqueléticos.	51
Figura 18	Curva atuarial de sobrevida global para os pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a expressão da NOS1.	52
Figura 19	Curva atuarial de sobrevida global para os pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a expressão da NOS2.	53
Figura 20	Curva atuarial de sobrevida livre de doença metastática, de acordo com a interação entre NOS1 e NOS2 nos condrossarcomas.	55
Figura 21	Curva atuarial de sobrevida global de acordo com a interação entre NOS1 e NOS2 nos condrossarcomas.	56

LISTA DE QUADROS, TABELAS E EQUAÇÃO

Quadro 1	Classificação da OMS para os condrossarcomas.	01
Quadro 2	Estadiamento dos tumores ósseos da Sociedade de Tumores Musculoesqueléticos.	07
Tabela 1	Anticorpos, clones, origens e diluições utilizadas.	18
Tabela 2	Escore para leitura imunohistoquímica das lâminas.	20
Tabela 3	Escore final da leitura das lâminas de imunohistoquímica.	20
Tabela 4	Frequência das variáveis demográficas e clínicas.	23
Tabela 5	Distribuição dos pacientes segundo o estadiamento.	24
Tabela 6	Distribuição dos pacientes segundo o grau histológico.	24
Tabela 7	Situação dos pacientes portadores de condrossarcoma no final do estudo.	26
Tabela 8	Expressões imunohistoquímicas nas amostras de cartilagem normal.	27
Tabela 9	Distribuição da frequência das expressões das NOS, nitrotirosina, COX-2 e CD34 nos condrossarcomas.	28
Tabela 10	Distribuição da frequência das expressões das NOS, nitrotirosina, COX-2 e CD34 nos condrossarcomas, de acordo com a sua localização.	29
Tabela 11	Associação entre NOS1, NOS2 e NOS3 com nitrotirosina nos condrossarcomas.	34
Tabela 12	Associação entre as expressões das NOS1, NOS2, NOS3 e nitrotirosina com COX-2 nos condrossarcomas.	35
Tabela 13	Associação entre as expressões das NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina e COX-2 com CD34 nos condrossarcomas.	36

Tabela 14	Associação entre as expressões da NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina, COX-2 e CD34, com a gradação histológica nos condrossarcomas.	37
Tabela 15	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença local para as variáveis clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas.	39
Tabela 16	Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença metastática para as variáveis clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas.	43
Tabela 17	Probabilidade acumulada de sobrevida global para as variáveis clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas.	48
Tabela 18	Análise multivariada para sobrevida livre de doença local.	54
Tabela 19	Análise multivariada para sobrevida livre de doença metastática para a interação das variáveis NOS1 e NOS2.	54
Tabela 20	Análise multivariada para sobrevida global.	56
Equação 1	Cálculo do escore final.	20

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	Condrossarcoma	01
1.1.1	Condrossarcoma Central, Primário ou Convencional	02
1.1.2	Condrossarcoma Periférico ou Periosteal	04
1.1.3	Condrossarcoma Secundário	04
1.1.4	Condrossarcoma Desdiferenciado	05
1.1.5	Condrossarcoma Mesenquimal	06
1.1.6	Condrossarcoma de Células Claras	06
1.2	Estadiamento	07
1.3	Aspectos Biomoleculares	08
1.3.1	Molécula de Adesão - CD34	08
1.3.2	Óxido Nítrico	09
1.3.3	Ciclooxigenase-2	12
2	OBJETIVOS	15
3	CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	Casuística	16
3.2	Materiais e Métodos	17
3.2.1	Construção do array de tecido	17
3.2.2	Imunoistoquímica	18
3.2.3	Dados demográficos e clínicos	21
3.2.4	Análise Estatística	25
4	RESULTADOS	26
4.1	Imunoistoquímica	26
4.1.1	Análise da associação entre NOS e nitrotirosina	32
4.1.2	Análise da associação entre NOS e nitrotirosina com COX-2	32
4.1.3	Análise da associação entre NOS, nitrotirosina e COX-2 com a microcirculação	33

4.1.4	Análise da associação da NOS, nitrotirosina, COX-2 e da microcirculação com a gradação histológica	34
4.2	Análises de sobrevidas	35
4.2.1	Sobrevida livre de doença local	35
4.2.2	Sobrevida livre de doença metastática	40
4.2.3	Sobrevida global	44
4.2.4	Análise multivariada	52
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

ANEXOS

Anexo 1 **Ficha do paciente**

Anexo 2 **Esquema de TMA**

Anexo 3 **Banco de dados**

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONDROSSARCOMA

O condrossarcoma é o segundo mais freqüente tumor maligno primário dos ossos, representando 25% de todos sarcomas primários do esqueleto (DORFMAN e CZERNIAK 1995). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é um tumor maligno com diferenciação de cartilagem hialina pura, em que alterações mixóides, calcificações e ossificações podem estar presentes. Compreende um grupo de lesões com características morfológicas e comportamento clínico diversos (SCHAJOWICZ 1982; DORFMAN e CZERNIAK 1995; BERTONI et al. 2002).

A classificação da OMS, consagrada pelo tempo, torna-se complexa, pois leva em consideração diferentes fatores como origem, localização e características histológicas (SCHAJOWICZ 1982; DORFMAN e CZERNIAK 1995; DORFMAN et al. 2002).

Tipos de Condrossarcomas
Condrossarcoma Central, Primário ou Convencional
Condrossarcoma Periférico ou Periosteal
Condrossarcoma Secundário
Condrossarcoma Desdiferenciado
Condrossarcoma Mesenquimal
Condrossarcoma de Células Claras

Quadro 1 – Classificação da OMS para os condrossarcomas

1.1.1 Condrossarcoma Central, Primário ou Convencional

A maioria dos condrossarcomas (acima de 90%) cresce centralmente no osso previamente normal, e é classificada como central, primário ou convencional. Pode ser classificada de acordo com sua característica histológica em 3 graus.

Tradicionalmente dividimos de acordo com o grau histológico de O'NEAL e ACKERMANN (1952), que apresenta importância prognóstica. Esta classificação divide os condrossarcomas em grau I (ou bem diferenciados), grau II (ou moderadamente diferenciados) e grau III (ou pouco diferenciados), baseados principalmente na arquitetura tecidual e na anaplasia celular.

Segundo a OMS, mantém-se a gradação histológica em escala de 1 a 3, baseada no tamanho nuclear, coloração nuclear (ou hipercromasia) e celularidade (BERTONI et al. 2002):

- Grau 1: Tumores moderadamente celulares, com presença de núcleos redondos e hipercromáticos, de tamanhos uniformes. Ocasionalmente células binucleadas estão presentes. Sua citologia é bastante semelhante ao encondroma, tumor benigno, formador de cartilagem.
- Grau 2: Tumores são mais celulares e contêm um maior grau de atipia nuclear, hipercromasia e tamanho nuclear do que o grau 1.
- Grau 3: Tumores mais celulares e pleomórficos e atípicos do que o de grau 2. As mitoses são facilmente detectadas.

Notamos que por esta classificação, a gradação histológica pode se tornar bastante subjetiva, uma vez que não existem valores numéricos

relacionados à quantidade de células, tamanhos nucleares, pleomorfismos ou mitoses. Assim, podemos esperar uma variação, principalmente nos casos limítrofes de um examinador para outro.

Aproximadamente 90% dos condrossarcomas são de graus baixo ou intermediário, apresentando comportamento indolente e de baixo potencial metastático. Somente 5% a 10% são lesões de grau III, ou de alto grau, que possuem alto potencial metastático (DORFMAN e CZERNIAK 1995; BERTONI et al. 2002).

O pico de incidência está entre a 5^a e 7^a décadas de vida, sendo que a maioria dos pacientes tem mais de 50 anos de idade. O sexo masculino é discretamente mais acometido (GITELIS et al. 1981; LEE et al. 1999; RIZZO et al. 2001; BERTONI et al. 2002). Existe uma maior frequência de acometimento em ossos do tronco, cerca de 45% (25% em ossos da pelve e 20% em costelas), seguidos de fêmur (15%) e de úmero (10%) (DORFMAN e CZERNIAK 1995; BERTONI et al. 2002). Os sintomas mais frequentes são a dor e o aumento de volume (DORFMAN e CZERNIAK 1995; BERTONI et al. 2002).

O prognóstico tem sido associado ao tamanho da lesão, localização anatômica e grau histológico. Dentre os parâmetros histológicos (grau, necrose tumoral, índice mitótico e presença de matrix mixóide), o grau tem sido apontado como o único relacionado com recorrência local e metástases. Dentro das metástases, o pulmão é o órgão mais frequentemente acometido. Porém, a literatura revela um crescimento não controlado do tumor e um resultado fatal em 10% dos condrossarcomas grau I

(KREICBERGS et al. 1982; DORFMAN e CZERNIAK 1997; BERTONI et al. 2002).

1.1.2 Condrossarcoma Periférico ou Periosteal

Segundo a OMS o condrossarcoma periosteal é um tumor maligno de cartilagem hialina que ocorre na superfície do osso. Acomete indivíduos adultos, e o local mais freqüente é a metáfise distal do fêmur. Segundo os dados do SEER, apenas 3 dos 667 condrossarcomas estão nesta categoria (BERTONI et al. 2002).

As características histológicas são semelhantes ao do condrossarcoma convencional (DORFMAN e CZERNIAK 1997; BERTONI et al. 2002).

1.1.3 Condrossarcoma Secundário

Definimos o condrossarcoma secundário quando este tumor cresce a partir de uma lesão benigna precursora (osteocondroma ou encondroma). O risco de malignização nos osteocondromas solitários é de 2%; nas osteocondromatoses é de 5 a 25%; e nas encondromatoses de 24 a 30%. A idade de acometimento geralmente é menor do que nos condrossarcomas primários; e os ossos da cintura pélvica e escapular são os sítios mais freqüentes (BERTONI et al. 2002).

A maioria dos condrossarcomas secundários é de baixo grau (BERTONI et al. 2002). As características microscópicas não permitem

distinguir do condrossarcoma convencional sem dados clínicos ou radiográficas (DORFMAN e CZERNIAK 1997).

1.1.4 Condrossarcoma Desdiferenciado

O condrossarcoma desdiferenciado apresenta dois componentes claramente definidos, de tumor de cartilagem bem diferenciada, tanto de encondroma ou de condrossarcoma de baixo grau, justaposto com um sarcoma não cartilaginoso de alto grau (fibrohistiocitoma maligno é o mais freqüente, mas também podemos encontrar osteossarcoma, fibrossarcoma e rabdomiossarcoma) (DORFMAN e CZERNIAK 1997; MILCHGRUB e HOGENDOORN 2002).

Cerca de 10% dos condrossarcomas são desdiferenciados. A idade de acometimento está entre 50 a 60 anos de idade; e os ossos mais envolvidos são da pelve, fêmur e úmero (DORFMAN e CZERNIAK 1997; MILCHGRUB e HOGENDOORN 2002).

São neoplasias agressivas de prognóstico ruim. Apesar das terapias agressivas, aproximadamente 90% dos pacientes morrem com metástases em 2 anos (DORFMAN e CZERNIAK 1997; MILCHGRUB e HOGENDOORN 2002).

1.1.5 Condrossarcoma Mesenquimal

O condrossarcoma mesenquimal é um tumor maligno raro, caracteriza-se pela presença de um padrão bimórfico onde encontramos componentes altamente indiferenciados de células redondas e pequenas, e ilhas de cartilagem hialina bem diferenciada. Corresponde à cerca de 3 a 10% dos condrossarcomas (DORFMAN e CZERNIAK 1997; NAKASHIMA et al. 2002).

O pico de incidência está entre a 2ª e 3ª décadas da vida; e não há predileção entre os sexos. Os ossos do esqueleto axial são mais freqüentemente acometidos (crânio, costelas, pelve, vértebra). Existem relatos de pacientes com envolvimento de múltiplos ossos; e cerca de 1/3 a 1/5 das lesões são em partes moles, e as meninges são os sítios de envolvimento extraesquelético mais comuns (DORFMAN e CZERNIAK 1997; NAKASHIMA et al. 2002).

Os condrossarcomas mesenquimais apresentam forte tendência para recorrência local e metástases (DORFMAN e CZERNIAK 1997; NAKASHIMA et al. 2002).

1.1.6 Condrossarcoma de Células Claras

O condrossarcoma de células claras é uma variante rara e de baixo grau do condrossarcoma, que apresenta predileção para as porções epifisárias dos ossos longos. Histologicamente é caracterizada pela presença de células com componente de glicogênio que confere coloração

clara ao citoplasma das células ao lado de células de cartilagem hialina (DORFMAN e CZERNIAK 1997; MCCARTHY et al. 2002).

Corresponde à cerca de 2% dos condrossarcomas; a idade de acometimento mais freqüente está entre 25 e 50 anos; e é 3 vezes mais freqüente nos homens do que nas mulheres. Cerca de 2/3 dos casos envolvem as cabeças do úmero ou do fêmur (DORFMAN e CZERNIAK 1997; MCCARTHY et al. 2002).

1.2 ESTADIAMENTO

Nos tumores ósseos o estadiamento leva em consideração o grau de diferenciação histológica, bem como a extensão local e à distância, para estimar o prognóstico dos pacientes. A classificação pelo sistema TNM não é comumente utilizada porque esses tumores raramente causam metástases em linfonodos. Por esse motivo, adotamos o estadiamento da Sociedade de Tumores Musculoesqueléticos descrito por ENNEKING (1985) (DORFMAN et al. 2002) (Quadro 2).

Estadiamento dos Tumores Ósseos		
Estadiamento	Grau Histológico	Localização
IA	Baixo grau	Intracompartimental
IB	Baixo grau	Extracompartimental
IIA	Alto grau	Intracompartimental
IIB	Alto grau	Extracompartimental
III	Baixo ou alto grau	Metástase

Quadro 2 - Estadiamento da Sociedade de Tumores Musculoesqueléticos para os tumores ósseos.

1.3 ASPECTOS BIOMOLECULARES

1.3.1 Molécula de Adesão - CD34

O CD34 ou selectin-L é uma molécula de glicoproteína transmembrana originalmente identificada na linhagem de células de leucemia mielóide e foi inicialmente caracterizado como um marcador de células de origem hematopoiética e células endoteliais (ANDREWS et al. 1986; FINA et al. 1990).

A angiogênese é essencial para o crescimento do tumor e para o desenvolvimento de suas metástases. Uma rede de novos capilares no estroma do tumor facilita a oxigenação, o transporte de nutrientes e permite a remoção dos metabólitos tóxicos (FOLKMAN 1990; BLOOD e ZETTER 1990). A densidade vascular nos tumores tem sido relacionada com o prognóstico em certos tumores, como no câncer de mama, carcinoma prostático, carcinoma de não-pequenas células do pulmão e carcinoma gástrico (WEIDNER et al. 1991, 1992, 1993; MACCHIARINI et al. 1992; WAKUI et al. 1992; YAMAZAKI et al. 1994; MAEDA et al. 1995).

O CD34 tem sido identificado nas células endoteliais, particularmente naquelas envolvidas na angiogênese de tumores vasculares benignos e malignos (RAMANI et al. 1990; TRAWEEK et al. 1991).

O estudo da angiogênese nos tumores gigantocelulares e osteossarcomas osteoblásticos e fibroblásticos não demonstram essa correlação (SULH et al. 1996; MANTADAKIS et al. 2001). Outros

mecanismos não diretamente relacionados com a angiogênese devem estar envolvidos com o seu prognóstico (SULH et al. 1996).

Nos condrossarcomas, sabe-se que a densidade da microcirculação é maior nos de graus II e III (MCGOUGH et al. 2002). O estudo de 26 lesões cartilaginosas (5 encondromas e 21 condrossarcomas) demonstrou que todas apresentaram microcirculação na região peritumoral, e as densidades microvasculares dessas áreas estavam relacionadas com o grau histológicos. A microcirculação intratumoral foi encontrada nos condrossarcomas de alto grau (AYALA et al. 2000). Nenhum estudo analisa alterações microcirculatórias nos condrossarcomas e suas relações com metástases.

1.3.2 Óxido Nítrico (NO)

O NO é uma das 10 menores moléculas existentes. É um mensageiro celular com capacidade de difusão nos meios aquosos e lipídicos das membranas celulares (WOLF 1997), e participa de vários eventos fisiológicos nos sistemas cardiovascular, nervoso e imune (NATHAN 1992). Possui um elétron não pareado na sua órbita externa, tornando-a altamente reativa e de baixa meia-vida, o que dificulta o seu estudo. Por isso, sua análise é realizada de forma indireta, através da pesquisa de seus co-produtos ou da enzima relacionada à sua reação. O NO difere de outros mensageiros celulares por não necessitar da interação com um receptor específico para atuar. É produzido a partir da reação de conversão do aminoácido L-arginina e tem como co-produto a L-citrulina. Esta reação é

catalisada pelas isoformas da enzima sintase do óxido nítrico (NOS) (NATHAN 1992).

Há três isoformas da NOS: NOS1 ou neuronal (nNOS); NOS2 ou induzida (iNOS); e NOS3 ou endotelial (eNOS). Duas destas formas, a NOS1 e a NOS3, são cálcio dependentes e constitutivamente expressas; enquanto a NOS2 é cálcio independente e induzida por estímulos imunológicos (AMBS et al. 1998; EKMEKCIOGLU et al. 2000), predominantemente produzida por macrófagos após estímulo (SCHMIDT et al. 1992). As células com capacidade de produção de NO através da ação da NOS2 são as células do sistema imune como os macrófagos (WEINBERG et al. 1995), esplenócitos (YANG et al. 1995), neutrófilos, linfócitos T e natural-killer (XIAO et al. 1995) e células que não pertencem ao sistema imune incluindo condrócitos e osteoblastos (PALMER et al. 1993; KRÖNCKE et al. 1995). Diferente da NOS1 e NOS3 que produzem baixos níveis de NO, a NOS2 pode produzir e manter altos níveis de NO. Em geral, as ações tóxicas do NO estão relacionadas com o produto da NOS2, e não com os das NOS1 ou NOS3 (MONCADA et al. 1991; SINGER et al. 1996; EKMEKCIOGLU et al. 2000). Diversas doenças apresentam expressão alterada de NO, incluindo as neoplasias (FARRELL e BLAKE 1996).

A ação do NO nos tumores é dupla, tendo ações pro e anti-tumorais. O NO pode participar na carcinogênese, angiogênese, inibição da resposta imune, indução de apoptose e lise celular. A ação depende do local, da quantidade de NO produzido, da capacidade da célula tumoral em expressar determinadas proteínas, do tempo em que o NO interage com as células

alvo (JENKINS et al. 1995; AMBS et al. 1998; HAJRI et al. 1998; SWANA et al. 1999; MENDES et al. 2001). A expressão de NO tem sido descrita em neoplasias de vários sítios: ginecológicos, mama, sistema nervoso, pulmão, próstata, estômago, pâncreas, bexiga, colon, vascular e linfocitário (THOMSEN et al. 1994, 1995; COBBS et al. 1995; ROSBE et al. 1995; FUJIMOTO et al. 1997; RAJNAKOVA et al. 1997; WILSON et al. 1998; AMBS et al. 1998; HAJRI et al. 1998; WENINGER et al. 1998; SWANA et al. 1999; EKMEKCIOGLU et al. 2000; MENDES et al. 2001).

Nos condrossarcomas o NO tem sido pouco investigado. O estudo desse tumor nos camundongos, em que essas neoplasias são bem diferenciadas, demonstrou que há expressão de NOS2. E o estudo em cultura de condrossarcoma humano demonstrou que também há expressão de NOS2 (CESARE et al. 1998).

A expressão de NOS2 nas células endoteliais dos vasos tumorais e células neoplásicas reforça a teoria de que esta enzima regula a vascularização e o fluxo sanguíneo tumoral (AMBS et al. 1998; SOINI et al. 2001; KONG et al. 2002; KASPER et al. 2004). Nesses casos, o crescimento tumoral pode ser sustentado pelo aumento do fluxo sanguíneo, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular mediados pela produção prolongada e excessiva do NO pelo tumor (COBBS et al. 1995; DOI et al. 1996). Por outro lado, intrigantemente, a liberação do NO pelas células tumorais também pode participar de efeitos antiproliferativos pelo infiltrado de células inflamatórias (DOI et al. 1996).

Os danos produzidos pelo NO também podem ser atribuídos através da sua reação com o ânion de superóxido, que leva à produção de peroxinitrito que é um potente agente nitrosilante e nitrante, e de efeito tóxico para os genes. O peroxinitrito pode reagir com as tirosinas livres ou ligadas às proteínas, produzindo as nitrotirosinas. Estas são produtos estáveis e, portanto, a sua mensuração no tecido é considerada um marcador da formação de peroxinitrito e de atividade das NOS (OHSHIMA e BARTSCH 1994; SINGER et al. 1996; AMBS et al. 1998; HAJRI et al. 1998; SWANA et al. 1999; EKMEKCIOGLU et al. 2000). Além disso, o peroxinitrito é um estimulador da atividade da ciclooxigenase (COX) (LANDINO et al. 1996).

1.3.3 Ciclooxigenase-2 (COX-2)

As ciclooxigenases são enzimas que estão envolvidas nas sínteses de prostaglandinas (PG) a partir do ácido aracdônico. Elas catalizam a inserção da molécula de oxigênio no ácido aracdônico para formar um intermediário instável PGG₂ que é rapidamente convertido para PGH₂. Este origina várias PGs ativas, tromboxanos e prostaciclina que contribuem para muitos processos fisiológicos e patológicos (KASPER et al. 2004).

Existem duas isoformas da COX: COX-1 e COX-2. A primeira é expressa constitutivamente em muitos tecidos e parece ser responsável pela produção basal de PG. A COX-2 não é detectada em muitos tecidos normais, mas é altamente induzível por estímulos inflamatórios e mitóticos, e está fortemente implicada na tumorigênese. Por isso, o uso de inibidores da

COX-2 tem sido alvo de terapias e prevenção de cânceres (HIDA et al. 1998; TSUJII et al. 1998; DICKENS et al. 2002; KASPER et al. 2004).

A identificação do aumento de expressão da COX-2 nos tumores ocorreu inicialmente nos tipos colorretais. Desde então outras neoplasias foram estudadas como a de próstata, mama, estômago, sistema nervoso, pele, rabdomiossarcoma, osteossarcoma, tumor de Ewing (HIDA et al. 1998; UEFUJI et al. 1998; DICKENS et al. 2002; SUTTON et al. 2004).

A COX-2 pode contribuir para a carcinogênese através de vários mecanismos. A PGE2 formada pelo COX-2 pode diminuir a imunidade local contra as células tumorais; o aumento do COX-2 pode inibir a apoptose, prolongando a vida das células com dano do DNA; o tromboxano derivado do COX-2, por ser um fator pro-agregante plaquetário, pode facilitar metástases tumorais pelas interações célula tumoral-plaqueta; e as células com aumento de expressão da COX-2 produzem PGs que são fatores pro-angiogênicos e estimulam a migração endotelial e formação tubular dos vasos sanguíneos (TSUJII et al. 1998; UEFUJI et al. 1998; KONG et al. 2002).

Os tecidos humanos que contêm RNA mensageiro para produção de COX-2 incluem o pulmão, útero, testículo, cérebro, pâncreas, rim, timo, próstata, glândula mamária, estômago, e intestino delgado. O estudo nos condrócitos da cartilagem humana demonstrou que essas células também expressam RNA mensageiro para COX-2 e sua proteína quando ativados por IL-1 (GENG et al. 1995).

Estudos *in vivo* demonstram que o NO estimula a síntese de PGs, nos órgãos e nos macrófagos através da ativação direta da COX (LANDINO et al. 1996), e o NO produzido pela NOS2 aumenta a expressão e a atividade da COX-2 (KONG et al. 2002).

O estudo em 32 tumores cartilaginosos (8 encondromas e 24 condrossarcomas) mostrou que nenhum dos tumores benignos expressou COX-2; enquanto 54,17% dos condrossarcomas apresentaram expressão positiva (SUTTON et al. 2004). Por esse motivo, o trabalho sugeriu que COX-2 pode ter algum papel no desenvolvimento desses tumores e que o uso de inibidores de COX-2 pode ter algum efeito no seu tratamento.

2 OBJETIVOS

Frente à literatura analisada, pode-se constatar que a análise desses marcadores biomoleculares em condrossarcomas e suas correlações clínico-patológicas são pobremente estudadas. Portanto, os objetivos deste estudo são:

1. Avaliar as expressões de NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina, COX2 e CD34 nos condrossarcomas;
2. Avaliar se existe relação entre as expressões das NOS1, NOS2 e NOS3 com nitrotirosina nos condrossarcomas;
3. Avaliar se existe relação entre as expressões das NOS1, NOS2, NOS3 e nitrotirosina com COX-2 nos condrossarcomas;
4. Avaliar se existe relação entre as expressões das NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina e COX-2 com CD34 nos condrossarcomas;
5. Avaliar se existe relação entre as expressões de cada um desses marcadores com os graus histológicos;
6. Avaliar se existe relação entre as expressões de cada um desses marcadores com o prognóstico dos pacientes portadores de condrossarcoma.

3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram identificados 170 pacientes portadores de condrossarcoma a partir do levantamento de prontuários do Serviço de Arquivo Médico do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A. C. Camargo entre o período de 1953 a 2004. Foram coletados dados desses prontuários, de acordo com a ficha em anexo (Anexo 1).

A partir da casuística levantada foi realizada a revisão dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A. C. Camargo. Todos os casos foram revisados por um único patologista (Dra. Isabela Werneck da Cunha) para confirmação do diagnóstico anatomopatológico e para classificação histológica.

Após revisão anatomopatológica, foram incluídos 101 casos da amostra inicial, com confirmação diagnóstica, que possuíam blocos de parafinas contendo fragmentos tumorais provenientes da biópsia original ou da peça operatória. As secções foram obtidas e coradas por hematoxilina e eosina para a seleção da área representativa. A partir desta seleção foi construído um bloco pela técnica de *tissue microarray* (TMA) .

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Construção do Array de Tecido

O TMA foi construído utilizando-se o dispositivo técnico chamado de “tissue microarrayer” (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA). A área identificada no bloco de parafina doador foi puncionada duas vezes com agulha de 1mm e os cilindros obtidos foram transferidos para o bloco de parafina receptor. Além dos fragmentos de tumor, foram também incluídos 5 amostras de tecido cartilaginoso normal, obtidas a partir de autópsias, ou peças cirúrgicas de pacientes não portadores de condrossarcoma e sem envolvimento ósseo ou da cartilagem articular. Um mapa para identificação detalhada de cada cilindro foi construído em planilha de Excel®, permitindo a localização precisa de cada caso (Anexo 2). Um caso foi definido como adequado quando o corte resultante ocupava pelo menos 25% da área total do cilindro. Foram realizados cortes seqüenciais de 4 μ m de espessura, que foram colhidos em lâminas adesivas oriundas da Instrumedics Inc (Hackensack NJ, EUA). Para maximizar o uso do TMA, todos os cortes foram colhidos em uma única sessão e armazenados para uso posterior. O controle do número de casos avaliáveis foi realizado pela coloração de 1 lâmina a cada 25 cortes e pela contagem de quantos cilindros estavam presentes. O TMA foi considerado esgotado quando mais do que 25% das amostras não estavam presentes nos cortes.

3.2.2 Imunoistoquímica

Os cortes obtidos foram submetidos à técnica imunoistoquímica para detecção de marcadores listados na tabela 1. Foram realizadas as reações em duplicata. Considerando-se que os casos foram alocados no TMA em duplicata, o mesmo caso foi analisado em 6 secções diferentes, garantindo a análise da heterogeneidade do tumor.

Tabela 1 - Anticorpos, clones, origens e diluições utilizadas.

Antígeno	Clones	Origem	Diluição
NOS1	N31030	Transduction	1:50
NOS2	N32020	Transduction	1:25
NOS3	N30020	Transduction	1:100
Nitrotirosina		Dako	1:1000
COX-2	4H12	Novo Castra	1:3000
CD34	QBEnd 10	Dako	1:50

As reações de imunoistoquímica foram realizadas nos cortes histológicos representativos da neoplasia, pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®).

As lâminas foram previamente revestidas por solução de 3-aminopropyltriethoxy-silano (APTS-Sigma® A3648) diluída a 4% em acetona. Os cortes histológicos foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor com irradiação por panela de pressão utilizando-se tampão citrato 10mM pH 6.0 por 15 minutos, deixando mais 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol.) com três trocas de

5 minutos cada. A seguir, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários pesquisados, diluídos em títulos pré-estabelecidos (Tabela 3) em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (SIGMA, A9647, USA) e azida sódica (NaN_3), 0,1% por 2 horas, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Após a incubação as lâminas foram lavadas em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada. A seguir foram incubadas com o Link (DAKO A/S, K0690, Denmark) por 30 minutos em temperatura ambiente, seguidas por três lavagens de 5 minutos em PBS, e incubação com streptavidina HRP (DAKO A/S, K0690, Denmark) por 30 minutos a temperatura ambiente. Sofreram novas lavagens com PBS (três de 5 minutos), e então foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, Sigma®) a 60mg% e contra coradas com hematoxilina de Harris (Merck®).

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e os resultados foram classificados baseados nos escores utilizados por SOINI et al. (2001) e KASPER et al. (2004), com algumas modificações. Foram consideradas as marcações na célula tumoral quanto à intensidade da reação e frequência de células positivas (Tabela 2). Para obter o escore final (Tabela 3), multiplicamos a intensidade pela frequência em todas as 6 secções, fizemos a somatória desses valores, e dividimos por 6 (número de secções analisadas) (Equação 1).

Tabela 2 - Escore para leitura imunoistoquímica das lâminas.

Intensidade	Frequência
0: Negativo	0: < 1%
1: Fraco	1: 1% - 10%
2: Moderado	2: > 10% - 50%
3: Forte	3: > 50% - 90%
	4: > 90%

Equação 1 - Cálculo do escore final.

$$\text{Escore Final} = \frac{\sum (\text{Escore da intensidade} \times \text{Escore da frequência}) \text{ nas 6 secções}}{6 \text{ (Número das secções analisadas)}}$$

Tabela 3 - Escore final da leitura das lâminas de imunoistoquímica.

Categoria	Valores do escore (Equação1)
Negativa	0 a 1,9
Positiva Fraca	2,0 a 4,9
Positiva Média	5,0 a 9,0
Positiva Forte	9,1 a 12,0

Para a análise da angiogênese os cortes foram corados da maneira tradicional, sem a utilização do TMA, uma vez que esta análise é área dependente.

A quantificação da angiogênese realizada através da marcação com CD34, foi feita através de ocular estequiométrica, no aumento de 400x. Foram identificadas as áreas mais vascularizadas. A partir dessas áreas, conhecidas como "hot spot", foram contados 10 campos consecutivos. A porcentagem de área vascular de um tumor foi o resultado da média aritmética dos 10 campos. Também foram considerados o padrão dos vasos

(pequenos, médios ou grandes) e a localização dos vasos encontrados (intra ou peritumoral) (AYALA et al. 2000).

3.2.3 Dados demográficos e clínicos

A idade dos 101 pacientes variou entre 11 e 73 anos (média 39,82). Cinquenta e sete pacientes (56,4%) eram do sexo masculino e 44 (43,6%) feminino.

Considerando os 65 pacientes dos quais havia informação sobre o grupo étnico, 54 (83,1%) eram brancos e 11 (16,9%) não brancos.

Sessenta pacientes (59,4%) apresentavam tumor localizado no segmento axial; 9 (8,9%) nos membros superiores e 32 (31,7%) nos membros inferiores. O tamanho tumoral variou de 3 a 40 cm (média 13,29).

Na admissão, 92 pacientes (91,1%) apresentavam doença loco-regional e 9 (8,9%) com doença loco-regional e à distância. Sessenta e três pacientes (62,4%) apresentavam-se com o tumor intacto ou submetido apenas à biópsia prévia. Vinte e nove (28,7%) tinham passado cirúrgico e 9 (8,9%) haviam sido submetidos à quimioterapia e/ou radioterapia prévia.

Considerando os 29 pacientes previamente operados, 20 (68,97%) haviam sido submetidos a uma única cirurgia e 9 (31,03%) pacientes submetidos a cirurgias múltiplas.

Após a admissão, 7 pacientes (6,9%) não foram submetidos a tratamento cirúrgico; 62 (61,4%) foram submetidos à ressecção com preservação de membro; 23 (22,8%) à ressecção sem preservação de membro e 8 (7,9%) à ressecção marginal ou paliativa. Em relação às

margens cirúrgicas, excluindo 10 casos em que não havia este dado no prontuário, 64 (76,2%) estavam livres e 20 (23,8%) comprometidas. Trinta e três pacientes (32,7%) receberam quimioterapia e/ou radioterapia neo ou adjuvante.

Sessenta e um pacientes (60,4%) não apresentaram recidivas; 16 (15,8%) tiveram recidiva local; 5 (5%) recidiva à distância; 8 (7,9%) local e à distância; 3 (3%) dos pacientes apresentaram recidiva local e metástase ao diagnóstico; 6 (5,9%) apenas com metástase no diagnóstico e 2 pacientes não tiveram o tumor primário tratado.

O perfil dos 101 pacientes da amostra pode ser avaliado na tabela 4.

Tabela 4 - Frequência das variáveis demográficas e clínicas.

Variável	Categoria	N	(%)
Idade	≤ 30 anos	30	29,7
	31 - 45 anos	35	34,7
	> 45 anos	36	35,5
Sexo	Masculino	57	56,4
	Feminino	44	43,6
Grupo étnico	Branco	54	83,1
	Não branco	11	16,9
Localização	Axial	60	59,4
	Membros superiores	9	8,9
	Membros inferiores	32	31,7
Tamanho	≤ 5 cm	13	12,9
	> 5 a 10 cm	23	22,8
	> 10 a 15 cm	18	17,8
	> 15 cm	26	25,7
	Ignorado	21	20,8
Situação admissão	Intacto/biopsiado	63	62,4
	Operado	29	28,7
	Químio e/ou radioterapia	9	8,9
Cirurgias prévias	0	72	71,3
	1	20	19,8
	≥ 2	9	8,9
Status admissão	loco-regional	92	91,9
	loco-regional e à distância	9	8,9
Tto complementar HACC	Químio e/ou radioterapia	33	32,7
	Não	68	67,3
Cirurgia no HACC	Não	7	6,9
	Com preservação de membro	62	61,4
	Sem preservação de membro	23	22,8
	Marginal ou paliativa	8	7,9
Margens	Livres	64	76,2
	Comprometidas	20	19,8
Recidiva	Não	61	60,4
	Local	16	15,8
	Distância	5	5,0
	Local e distância	8	7,9
	Local e metástase ao diagnóstico	3	3,0
	Metástase ao diagnóstico	6	5,9
	Primário não tratado	2	2,0

Tto: tratamento; HACC: Hospital do Câncer A. C. Camargo

De acordo com o estadiamento da Sociedade de Tumores Musculoesqueléticos proposta por ENNEKING (1985), nenhum paciente apresentava-se no estágio IA; 14 (13,9%) no IB; 5 (5%) IIA; 73 (72,3%) no IIB e 9 (8,9%) no III (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes de acordo com o estadiamento.

Estadiamento de Enneking	N	(%)
IA	0	0
IB	14	13,9
IIA	5	5,0
IIB	73	72,3
III	9	8,9

Em relação à distribuição anatomopatológica segundo o grau histológico, os condrossarcomas de células claras foram agrupados nos de grau I, e os condrossarcomas desdiferenciados e mesenquimais foram agrupados nos de grau III. A amostra consistia de 15 (14,9%) grau I, 63 (62,4%) grau II e 23 (22,8%) grau III (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes de acordo com o grau histológico.

Grau Histológico	N	(%)
I / baixo grau	15	14,9
II / moderado grau	63	62,4
III / alto grau	23	22,8

No final do estudo, os pacientes foram classificados nas seguintes categorias:

- a. vivos sem câncer;
- b. vivos com câncer;
- c. óbito pelo câncer ou por complicações do tratamento, incluindo óbito pós-operatório (até 30 dias após a cirurgia);
- d. óbito por outras causas;
- e. perdidos no seguimento (quando não se obteve informação em um período maior que duas vezes o período estipulado pelo médico para seu retorno).

3.2.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o uso do programa estatístico "SPSS 12.0 for Windows". Para análise da associação entre as expressões das NOS e nitrotirosina; entre NOS, nitrotirosina e COX-2; entre NOS, nitrotirosina, COX-2 e CD34; entre cada um dos marcadores e os graus histológicos foi utilizado o teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher quando necessário.

A sobrevida livre de doença local, de doença metastática e global foram analisadas pelo método de Kaplan-Meier, e a comparação das curvas, pelo teste de Log-rank. Para a análise multivariada para as sobrevidas foi utilizado o modelo de regressão de COX.

Foram considerados valores estatisticamente significativos, quando p foi menor que 0,05.

4 RESULTADOS

O período de seguimento variou de 0,76 a 437,24 meses, com média de 87,01 meses; e mediana de 55,99 meses. Ao final, 51 (50,5%) estavam vivos sem doença; 3 (3%) vivos com câncer; 30 (29,7%) morreram em decorrência da neoplasia ou complicação do tratamento; 7 (6,9%) morreram de outras causas e 10 (9,9%) foram perdidos de vista (Tabela 7).

Tabela 7 - Situação clínica dos 101 pacientes portadores de condrossarcoma no final do estudo.

Situação Clínica	N	(%)
Vivos sem doença	51	50,5
Vivos com câncer	3	3,0
Óbitos por câncer ou complicação do tratamento	30	29,7
Óbitos por outras causas	7	6,9
Perdidos no seguimento	10	9,9

Seguimento (meses): média 87,01; mediana 55,99 (0,76 a 437,24).

4.1 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações imunoistoquímicas nas 5 amostras de tecido cartilaginoso normal, para os marcadores estudados, apresentaram marcação de intensidade fraca ou negativa (Tabela 8).

Tabela 8 - Reações imunoistoquímicas nas amostras de cartilagem normal.

Marcador	N	Intensidade	Frequência	Score Final (Equação 1)
NOS1	5	Positiva fraca	<1%	Negativa
NOS2	3	Negativa		Negativa
	2	Positiva fraca	<1%	
NOS3	5	Positiva fraca	<1%	Negativa
Nitrotirosina	5	Positiva fraca	<1%	Negativa
COX-2	2	Negativa		Negativa
	3	Positiva fraca	<1%	

Foi realizado uma análise estatística prévia e constatado que havia semelhança histológica quando as expressões eram positivas fraca, média e forte nas NOS e nitrotirosina. Portanto, foram agrupadas da mesma forma como positivas. Em relação a COX-2, foi observado que as marcações negativa e positiva fraca, comportavam-se de maneiras semelhantes e, portanto foram agrupadas da mesma forma como negativas. Em relação a microcirculação foram considerados a presença de vasos intra ou peritumorais.

A imunorreatividade do NOS1 foi negativa em 34 condrossarcomas (33,7%); positiva em 58 (57,4%) e não foi avaliável em 9 (8,9%). Dentre os 58 casos de expressão positiva, a marcação foi evidenciada em 8 (13,8%) casos no núcleo, 10 (17,2%) no citoplasma, e 40 (69,0%) no núcleo e citoplasma. Para a NOS2 foi negativa em 63 (62,4%); positiva em 31 (30,7%) e não foi avaliável em 7 (6,9%). Em todos os casos, a positividade ocorreu no citoplasma. Na NOS3 foi negativa em 22 (21,8%); positiva em 72 (71,3%) e não foi avaliável em 7 (6,9%). Dentre os 22 casos de positividade,

a distribuição da marcação ocorreu em 1 (1,4%) caso no núcleo, 37 (51,4%) no citoplasma, e 34 (47,2%) no núcleo e citoplasma (Tabela 9 e 10).

A expressão da nitrotirosina foi negativa em 18 (17,8%) dos condrossarcomas; positiva em 56 (55,4%); e não foi avaliável em 27 (26,7%). Dentre os 56 casos com expressão positiva, em 39 (69,6%) casos a marcação ocorreu no citoplasma; e em 17 (30,4%) no núcleo e citoplasma (Tabela 9 e 10).

A imunistoquímica para a COX-2 foi negativa em 56 condrossarcomas (55,4%); positiva em 37 (36,6%) e não foi avaliável em 8 (7,9%). Em todos os casos, a positividade da expressão ocorreu no citoplasma (Tabela 9 e 10).

A frequência de vasos peritumorais foi de 74 (73,3%) e intratumorais de 27 (26,7%) (Tabela 9 e 10).

Tabela 9 - Distribuição da frequência das expressões avaliáveis das NOS, nitrotirosina, COX-2 e CD34 nos condrossarcomas.

Marcadores	Expressão	N	(%)
NOS1	Negativa	34	37,0
	Positiva	58	63,0
NOS2	Negativa	63	67,0
	Positiva	31	33,0
NOS3	Negativa	22	23,4
	Positiva	72	76,6
Nitrotirosina	Negativa	18	24,3
	Positiva	56	75,7
COX-2	Negativa	56	60,2
	Positiva	37	39,8
CD34	Peritumorais	74	73,3
	Intratumorais	27	26,7

Tabela 10 - Distribuição da frequência das expressões avaliáveis das NOS, nitrotirosina, COX-2 e CD34 nos condrossarcomas, de acordo com a sua localização.

Marcador	Localização da Expressão	N	(%)
NOS1	Núcleo	8	13,8
	Citoplasma	10	17,2
	Núcleo e Citoplasma	40	69,0
NOS2	Citoplasma	31	100,0
NOS3	Núcleo	1	1,4
	Citoplasma	37	51,4
	Núcleo e Citoplasma	34	47,2
Nitrotirosina	Citoplasma	39	69,6
	Núcleo e Citoplasma	17	30,4
COX-2	Citoplasma	37	100,0

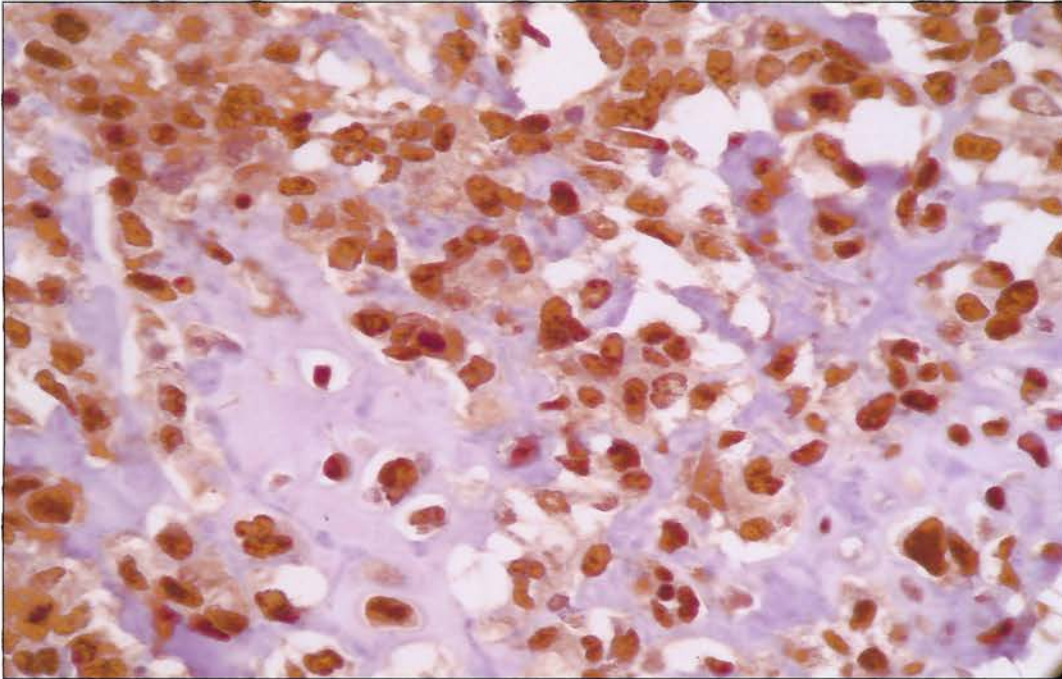


Figura 1 - Expressão da NOS1, de intensidade forte, em >90% das células, em condrossarcoma de grau III. Objetiva com aumento de 200x.

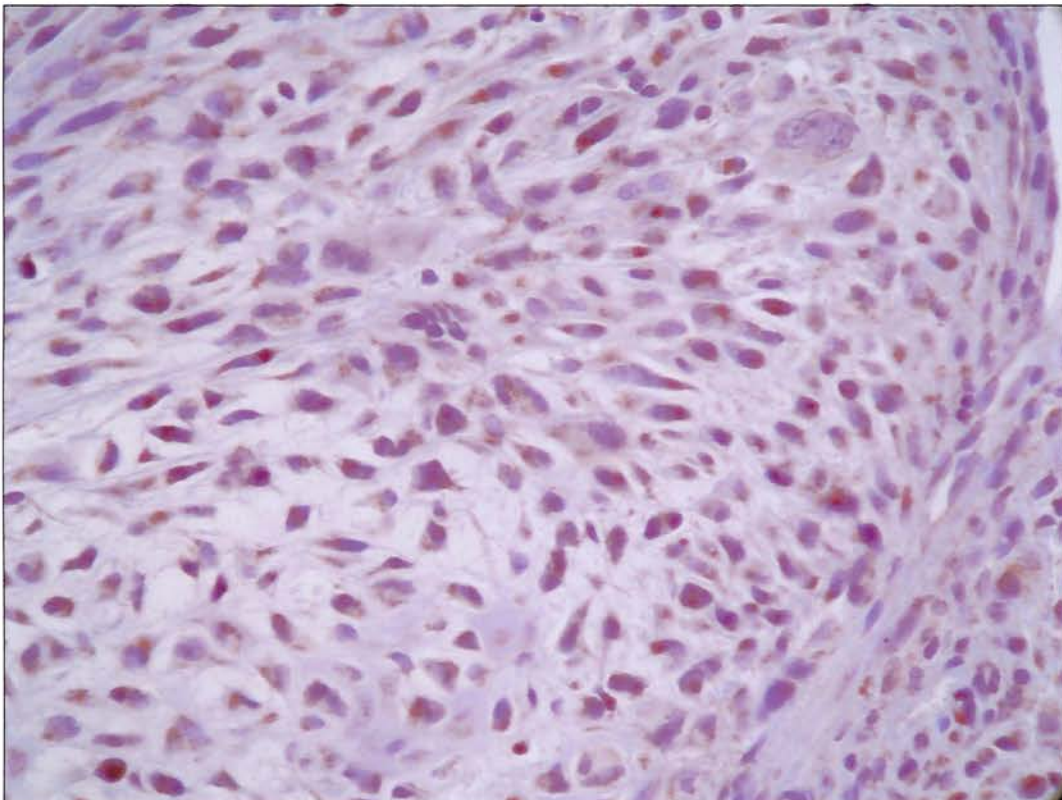


Figura 2 - Expressão da NOS2, de intensidade moderada, em >90% das células, em condrossarcoma de grau II. Objetiva com aumento de 200x.

FUNDAÇÃO ANTONIO RUIZEMIL
Adriana Cortez
Ana Márcia Rodrigues Alves Kuninari
Diretora de Escola
RG 6.080.136

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA

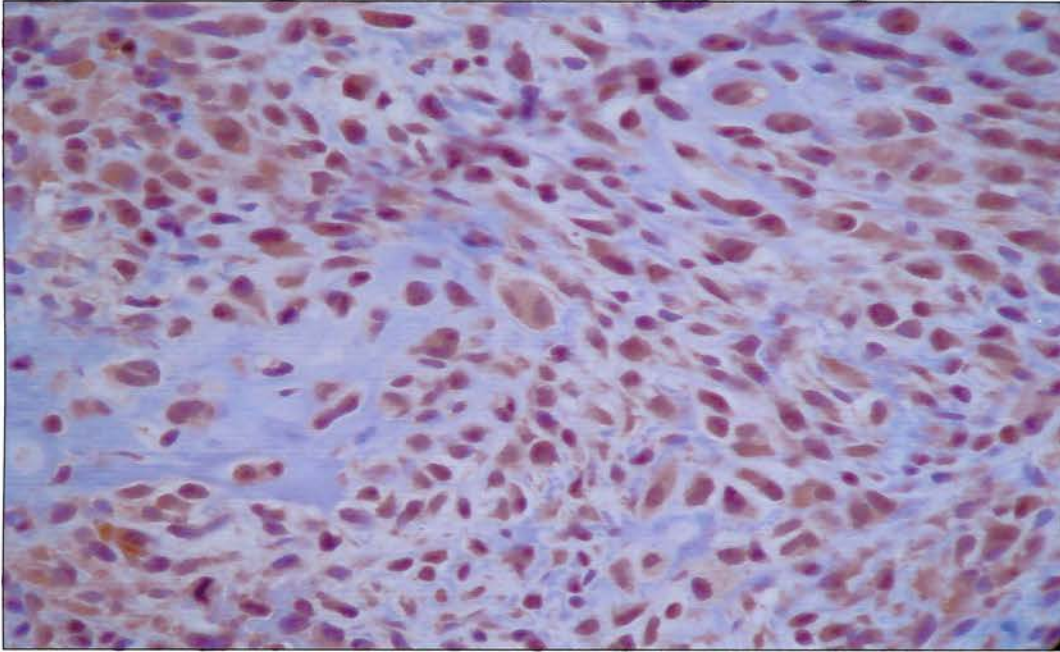


Figura 3 - Expressão da NOS3, de intensidade forte, em >90% das células, em condrossarcoma de grau II. Objetiva com aumento de 200x.

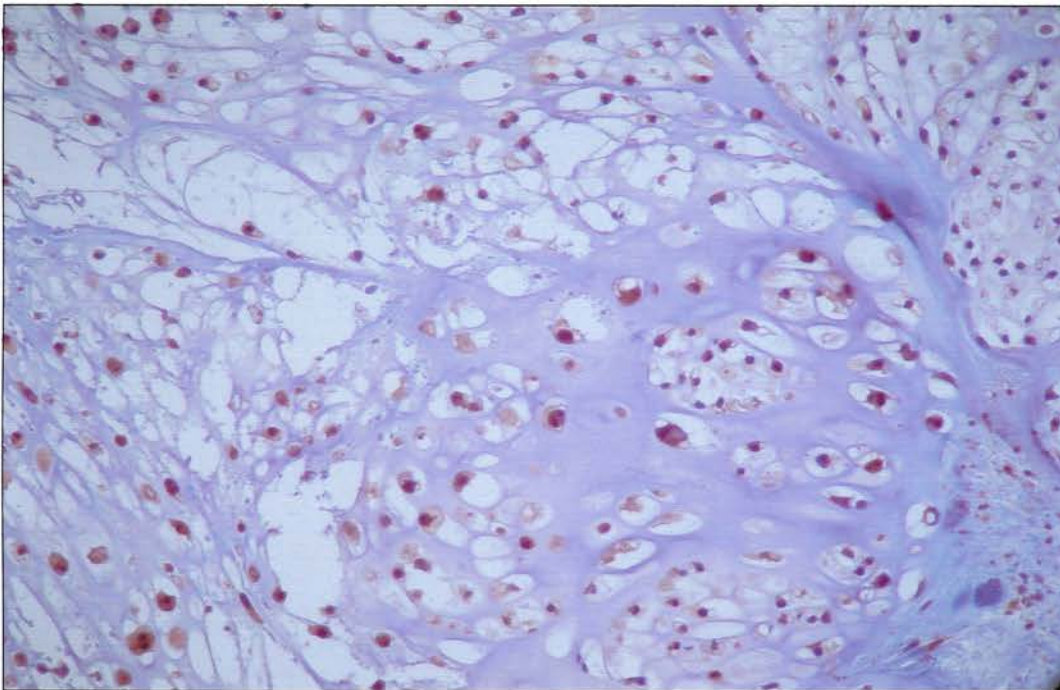


Figura 4 - Expressão da nitrotirosina, de intensidade moderada, em >90% das células, em condrossarcoma de grau II. Objetiva com aumento de 100x.

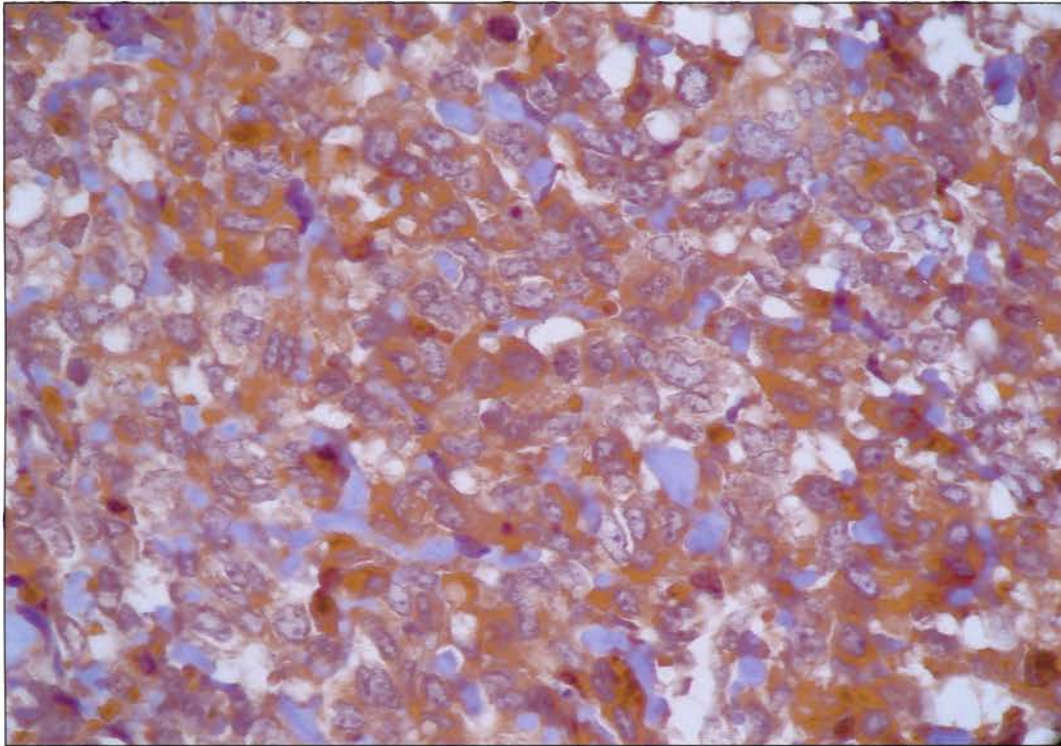


Figura 5 - Expressão da COX-2, de intensidade forte, em >90% das células, em condrossarcoma de grau III. Objetiva com aumento de 200x.

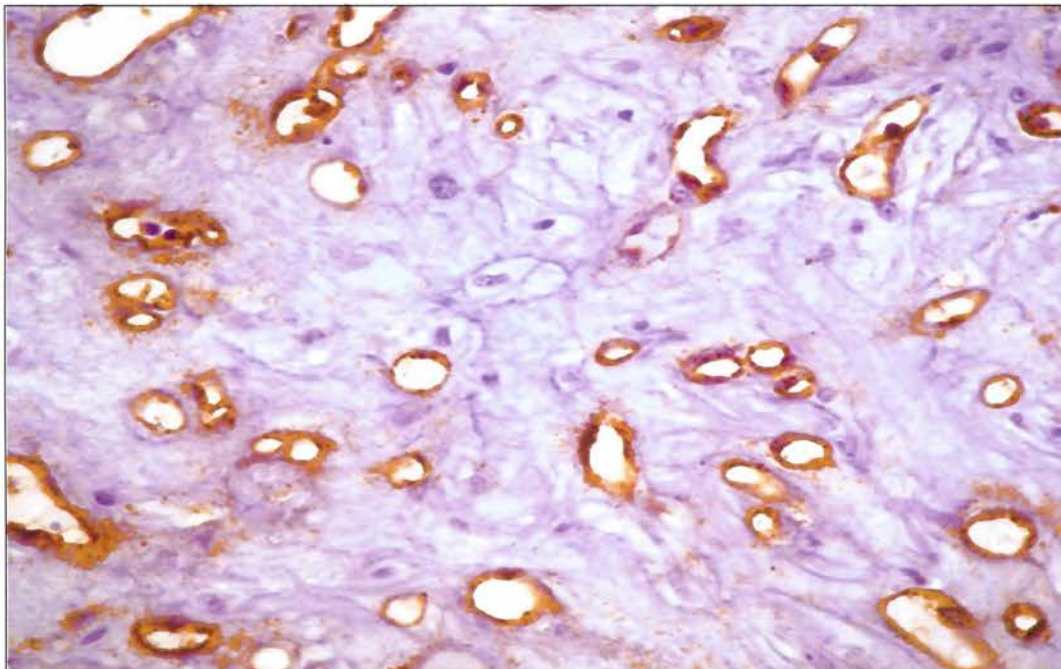


Figura 6 - Expressão de CD34, nos vasos intratumorais. Objetiva com aumento de 400x.

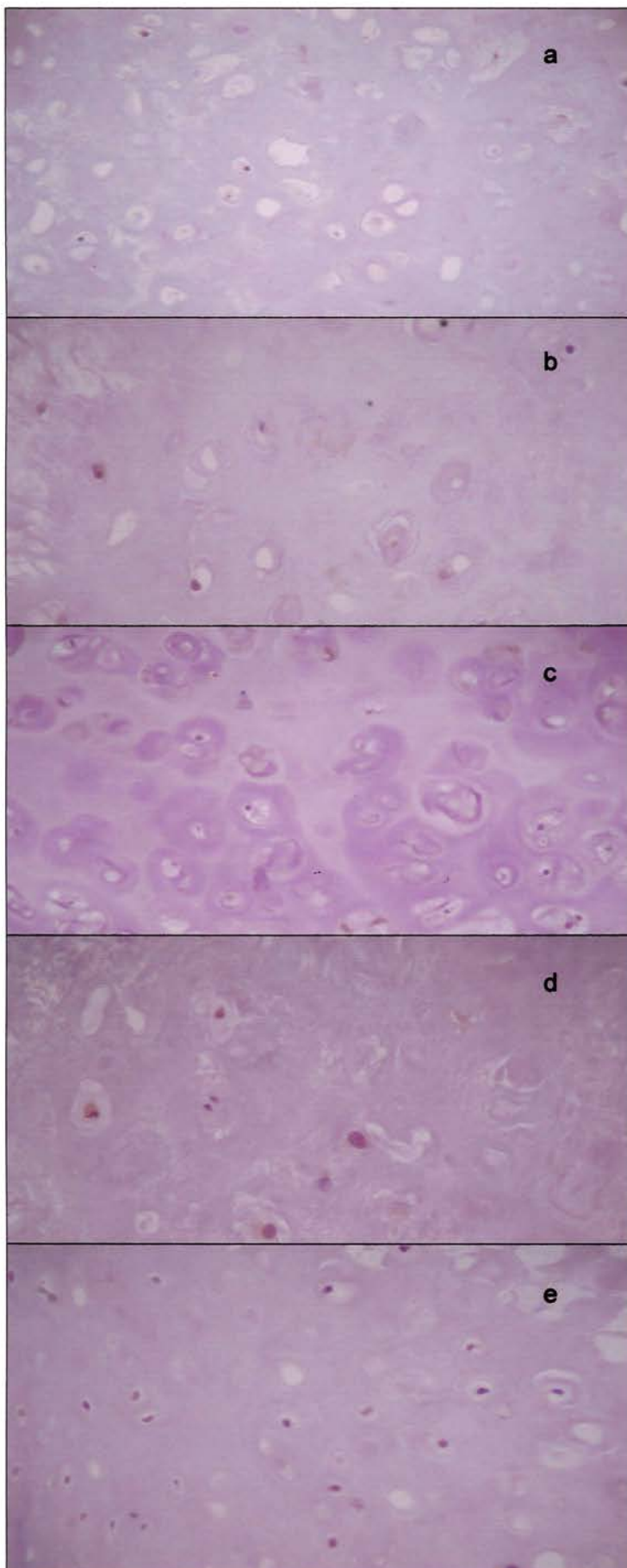


Figura 7 – Expressões de (a) NOS1 (200x); (b) NOS2 (400x); (c) NOS3 (200x); (d) nitrotirosina (400x) e (e) COX-2 (200x) com intensidades positivas fracas, em <1% das células em amostras de cartilagem normal.

4.1.1 Análises das associações entre NOS e nitrotirosina

As expressões das NOS1, NOS2 e NOS3 apresentaram associação com a expressão da nitrotirosina nos condrossarcomas ($p=0,039$; $p=0,045$ e $p<0,001$, respectivamente) (Tabela11)

Tabela 11 - Associação entre NOS1, NOS2 e NOS3 com nitrotirosina nos condrossarcomas.

Marcador	Expressão	Nitrotirosina				p
		Negativa		Positiva		
		N	(%)	N	(%)	
NOS1	Negativa	9	40,9	13	59,1	0,039
	Positiva	9	18,0	41	82,0	
NOS2	Negativa	15	31,9	32	68,1	0,045
	Positiva	3	11,1	24	88,9	
NOS3	Negativa	10	66,7	5	33,3	<0,001
	Positiva	8	13,8	50	86,2	

4.1.2 Análises das associações entre NOS e nitrotirosina com COX-2

As expressões das NOS1, NOS2 e NOS3 apresentaram associação com a expressão de COX-2 nos condrossarcomas, com $p=0,001$; $p<0,001$ e $p<0,001$, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12 - Associação entre as expressões das NOS1, NOS2, NOS3 e nitrotirosina com COX-2 nos condrossarcomas.

Marcador	Expressão	COX-2				p
		Negativa		Positiva		
		N	(%)	N	(%)	
NOS1	Negativa	28	82,4	6	17,6	0,001
	Positiva	25	45,5	30	54,5	
NOS2	Negativa	44	73,3	16	26,7	<0,001
	Positiva	9	31,0	20	69,0	
NOS3	Negativa	21	95,5	1	4,5	<0,001
	Positiva	33	48,5	35	51,5	
Nitrotirosina	Negativa	13	72,2	5	27,8	0,150
	Positiva	28	52,8	25	47,2	

4.1.3 Análises das associações entre NOS, nitrotirosina e COX-2 com a microcirculação

Todos os marcadores (NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina e COX-2) mostraram associação com CD34 (microcirculação), com $p < 0,001$; $p = 0,003$; $p = 0,006$; $p = 0,002$ e $p = 0,002$; respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13 - Associação entre as expressões das NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina e COX-2 com a microcirculação (CD34) nos condrossarcomas.

Marcador	Expressão	CD34				p
		Peritumorais		Intratumorais		
		N	(%)	N	(%)	
NOS1	Negativa	33	97,1	1	2,9	<0,001
	Positiva	33	56,9	25	43,1	
NOS2	Negativa	51	81,0	12	19,0	0,003
	Positiva	16	51,6	15	48,4	
NOS3	Negativa	21	95,5	1	4,5	0,006
	Positiva	47	65,3	25	34,7	
Nitrotirosina	Negativa	17	94,4	1	5,6	0,002
	Positiva	30	53,6	26	46,4	
COX-2	Negativa	47	83,9	9	16,1	0,002
	Positiva	20	54,1	17	45,9	

4.1.4 Análises das associações entre NOS, nitrotirosina, COX-2 e a microcirculação com a gradação histológica

As expressões da nitrotirosina, COX-2 e CD34 (microcirculação) apresentaram relação com a gradação histológica nos condrossarcomas, com $p=0,022$; $p=0,014$ e $p=0,028$ respectivamente; enquanto as NOS1, NOS2 e NOS3 não apresentaram associação estatisticamente significativas (Tabela 14).

Tabela 14 - Análise da associação entre as expressões da NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina, COX-2 e CD34, com a gradação histológica nos condrossarcomas.

Marcador	Expressão	Grau Histológico						p
		Baixo		Moderado		Alto		
		N	(%)	N	(%)	N	(%)	
NOS1	Negativa	3	8,8	25	73,5	6	17,6	0,348
	Positiva	9	15,5	34	58,6	15	25,9	
NOS2	Negativa	10	15,9	42	66,7	11	17,5	0,075
	Positiva	3	9,7	16	51,6	12	38,7	
NOS3	Negativa	2	9,1	16	72,7	4	8,2	0,610
	Positiva	9	12,5	44	61,1	19	26,4	
Nitrotirosina	Negativa	3	16,7	15	83,3	0	0	0,022
	Positiva	7	12,5	31	55,4	18	32,1	
COX-2	Negativa	9	16,1	39	69,6	8	14,3	0,014
	Positiva	3	8,1	19	51,4	15	40,5	
CD34	Peritumorais	11	14,9	51	68,9	12	16,2	0,028
	Intratumorais	4	14,8	12	44,4	11	40,7	

4.2 ANÁLISES DE SOBREVIDAS

4.2.1 Sobrevida livre de doença local

As taxas de sobrevida livre de doença local para os 101 pacientes portadores de condrossarcoma, aos 5 e 10 anos, foram respectivamente de 70,38% e 63,22% (Figura 8).

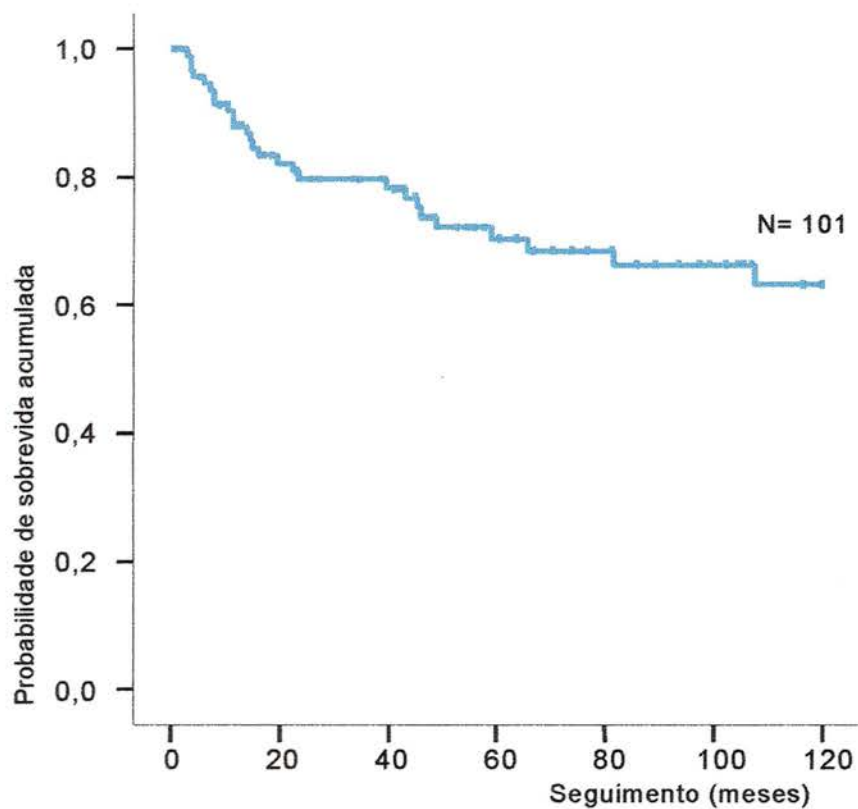


Figura 8 - Curva atuarial de sobrevida livre de doença local para os 101 pacientes portadores de condrossarcoma.

Dentre as variáveis clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas, as margens cirúrgicas e a NOS2 influenciaram significativamente a sobrevida livre de doença local ($p=0,015$ e $p=0,038$, respectivamente) (Tabela 15).

FUNDAÇÃO ANTÔNIO RODRIGUES
Ana Maria Costa
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Diretora de Escola
RG. 6.080.138

Tabela 15 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença local em 5 e 10 anos de acordo com variáveis clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença Local		p (Log rank)
		5 anos (%)	10 anos (%)	
Idade	≤ 30 anos	75,66	75,66	0,170
	31 - 45 anos	60,20	60,20	
	> 45 anos	74,79	50,78	
Localização	Axial	61,36	53,44	0,137
	M. superiores	75,00	60,00	
	M. inferiores	86,07	86,07	
Margens	Livres	77,11	74,03	0,015
	Comprometidas	63,56	27,81	
Status admissão	Loco-regional	71,58	64,25	0,190
	Loco-regional e à distância	60,00	60,00	
Cirurgias prévias	0	75,54	65,06	0,487
	1	67,94	61,76	
	≥2	55,56	55,56	
Situação admissão	Intacto/biopsiado	78,53	69,81	0,303
	Operado	62,96	58,46	
	Qt e/ou Rtx	58,33	38,89	
Grau	I	92,86	92,86	0,139
	II	66,03	58,05	
	III	65,42	57,24	
Est. Enneking	IB	92,31	92,31	0,188
	IIA	66,67	66,67	
	IIB	67,38	57,54	
	III	60,00	60,00	
NOS1	Negativa	76,37	72,35	0,256
	Positiva	68,33	63,45	
NOS2	Negativa	75,87	69,40	0,038
	Positiva	52,83	39,62	
NOS3	Negativa	60,84	60,84	0,662
	Positiva	75,14	65,49	
Nitrotirosina	Negativa	67,03	67,03	0,831
	Positiva	73,84	64,96	
CD34	Peritumoral	70,86	68,42	0,515
	Intratumoral	69,30	51,33	
COX-2	Negativa	74,69	71,45	0,186
	Positiva	68,02	51,01	

M.: membros; Qt: quimioterapia; Rtx: radioterapia; Est.: estadiamento.

De acordo com as margens cirúrgicas, as taxas de sobrevida livre de doença local quando as margens estavam livres foram de 77,11% e 74,03% aos 5 e aos 10 anos, respectivamente. E quando estavam comprometidas, foram de 63,56% e 27,81%, respectivamente (Figura 9).

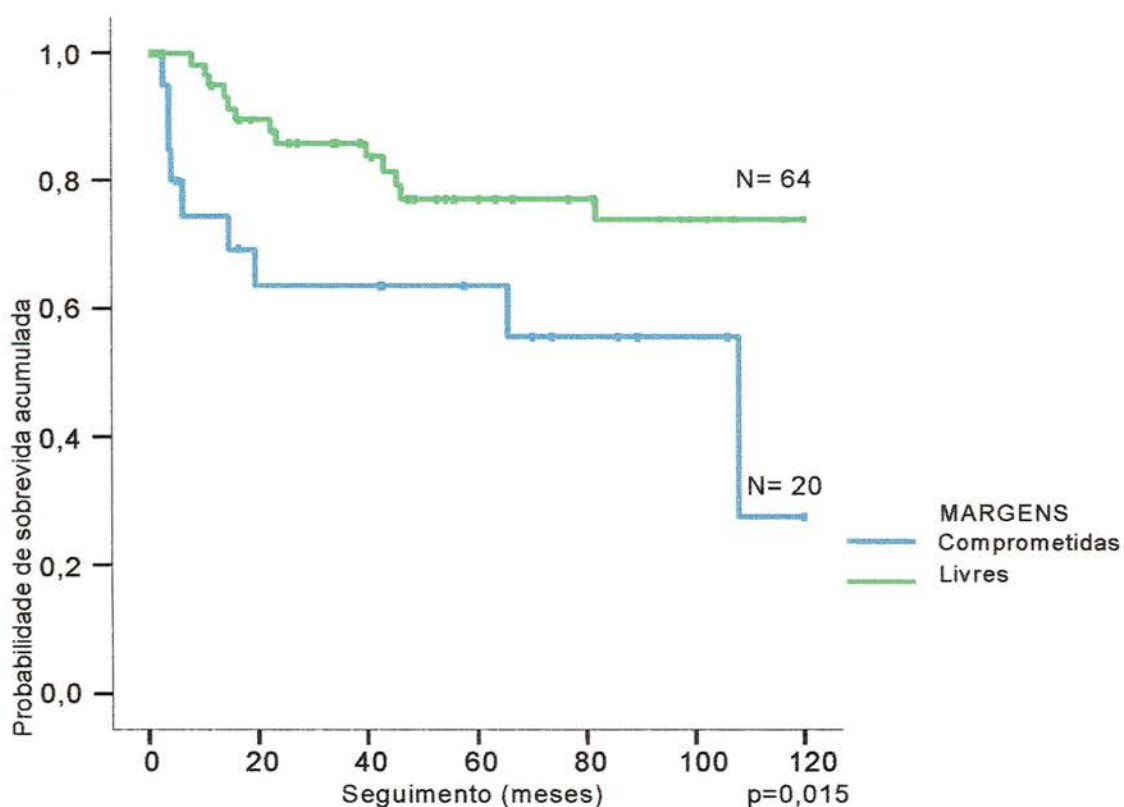


Figura 9 - Curva atuarial de sobrevida livre de doença local para os 84 pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com as margens cirúrgicas.

De acordo com a variável NOS2, a sobrevida livre de doença local aos 5 e aos 10 anos foram respectivamente de 75,87% e 69,40%, quando não havia expressão da NOS2; e quando sua expressão estava positiva foram de 52,83% e 39,62%, respectivamente (Figura 10).

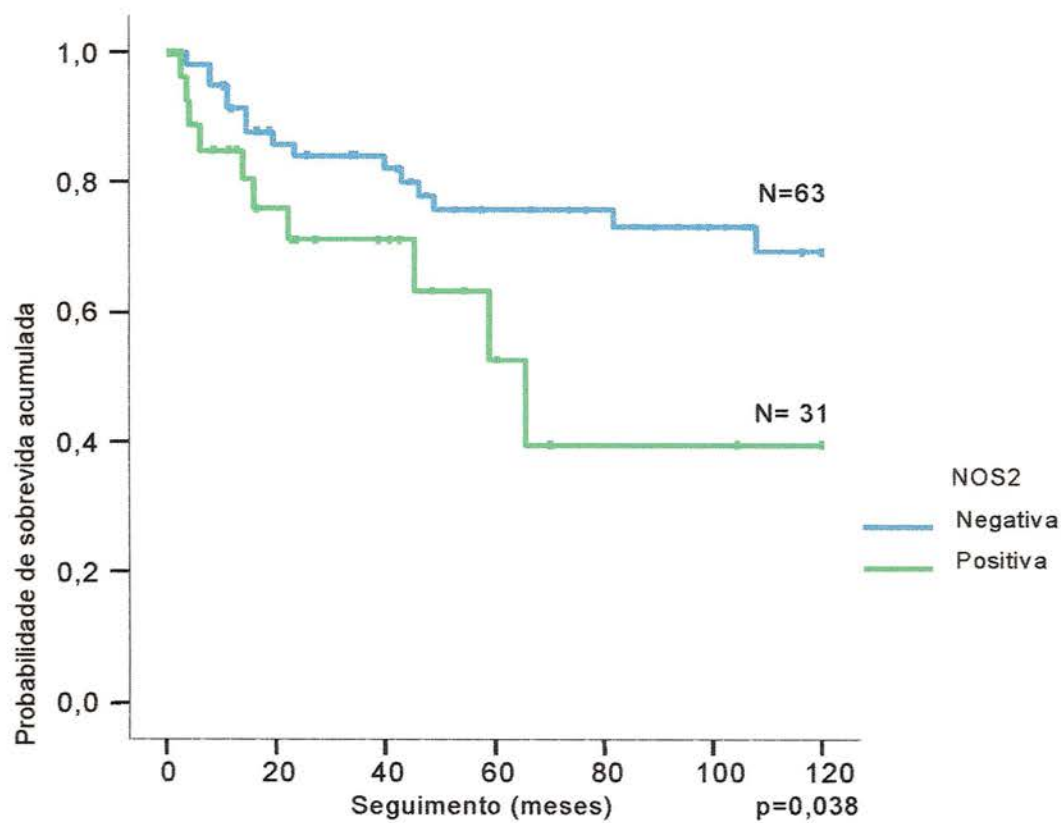


Figura 10 - Curva atuarial de sobrevida livre de doença local para os 94 pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a expressão imunoistoquímica de NOS2.

4.2.2 Sobrevida livre de doença metastática

As taxas de sobrevida livre de doença metastática para os 101 pacientes portadores de condrossarcoma, aos 5 e aos 10 anos, foram respectivamente de 84,23% e 80,72% (Figura 11).

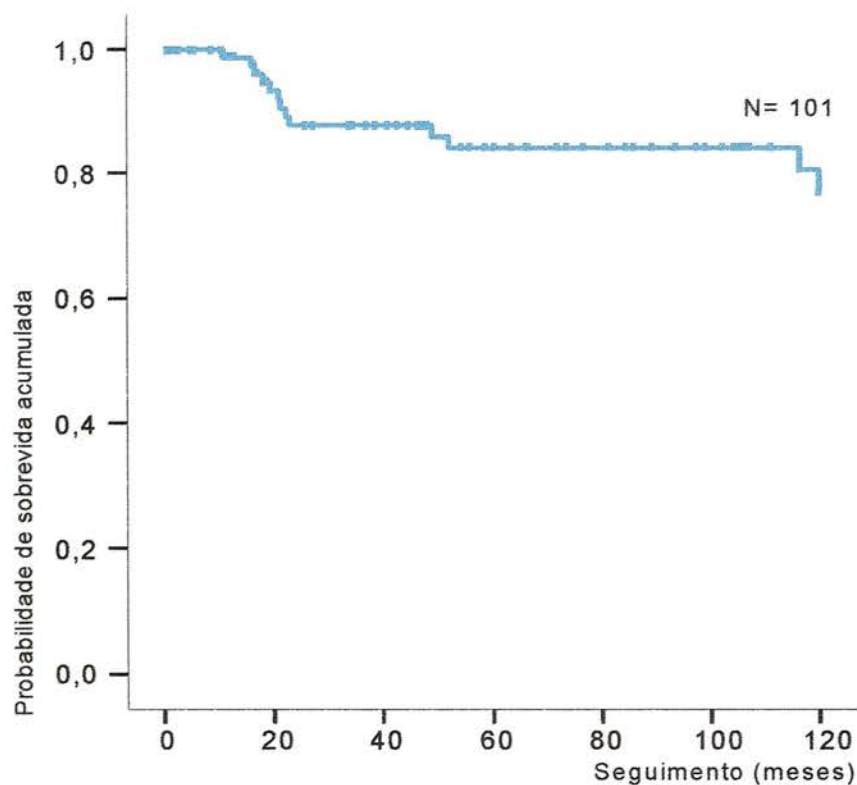


Figura 11 - Curva atuarial de sobrevida livre de doença metastática para os 101 pacientes portadores de condrossarcoma.

De acordo com as variáveis clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas, a expressão de NOS1 e NOS2 influenciaram a sobrevida livre de doença metastática ($p=0,022$ e $p=0,017$; respectivamente) (Tabela 16).

Tabela 16 - Probabilidade acumulada de sobrevida livre de doença metastática para as variáveis clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas para os 101 pacientes portadores de condrossarcoma.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença Metastática		p (Log rank)
		5 anos (%)	10 anos (%)	
Idade	≤ 30 anos	91,67	91,67	0,259
	31 - 45 anos	77,09	77,09	
	> 45 anos	82,64	72,31	
Localização	Axial	86,80	86,80	0,448
	M. superiores	75,00	50,00	
	M. superiores	82,90	82,90	
Margens	Livres	85,21	80,73	0,936
	Comprometidas	84,62	84,62	
Cirurgias prévias	0	82,19	75,34	0,508
	1	88,89	88,89	
	≥2	87,50	87,50	
Situação admissão	Intacto/biopsiado	83,35	83,35	0,151
	Operado	87,91	87,91	
	Qt e/ou Rxt	80,00	53,33	
Grau	I	90,00	90,00	0,824
	II	82,69	77,52	
	III	84,38	84,38	
Est. Enneking	IB	90,00	90,00	0,852
	IIA	66,67	66,67	
	IIB	84,30	79,34	
NOS1	Negativa	93,44	93,44	0,022
	Positiva	72,79	66,18	
NOS2	Negativa	89,69	85,61	0,017
	Positiva	62,49	62,49	
NOS3	Negativa	94,12	94,12	0,162
	Positiva	79,66	75,68	
Nitrotirosina	Negativa	92,31	92,31	0,376
	Positiva	83,51	77,94	
CD34	Peritumoral	83,48	83,48	0,818
	Intratumoral	86,27	73,95	
COX-2	Negativa	85,53	80,19	0,906
	Positiva	82,05	82,05	

M.: membros; Qt: quimioterapia; Rxt: radioterapia; Est.: estadiamento

De acordo com a NOS1, a sobrevida livre de doença metastática aos 5 e aos 10 anos foram de 93,44% quando sua expressão era negativa; e de 72,79% aos 5 anos e de 66,18% aos 10 anos, quando sua expressão estava positiva (Figura 12).

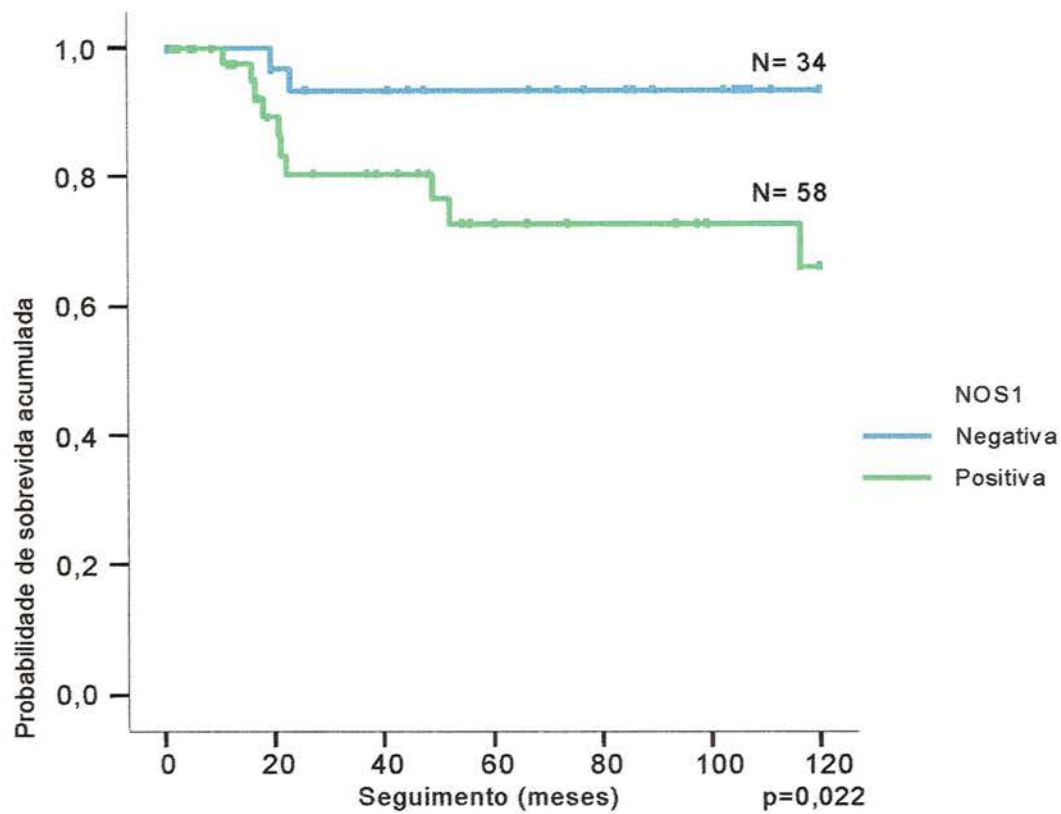


Figura 12 - Curva atuarial de sobrevida livre de doença metastática para os 92 pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a expressão imunoistoquímica de NOS1.

FUNDAÇÃO ANTÔNIO RUDENI
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
 Diretora de Escola
 RG. 8.080.138

4.2.3 Sobrevida global

As taxas de sobrevida global para os 101 pacientes portadores de condrossarcoma, aos 5 e aos 10 anos, foram respectivamente de 66,66% e 59,40% (Figura 14).

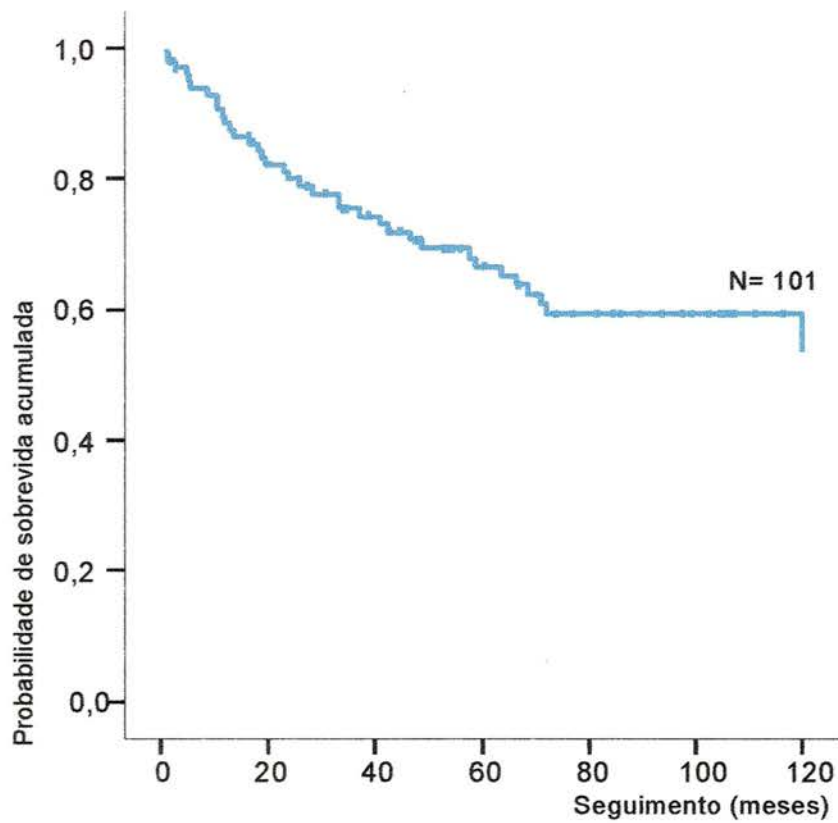


Figura 14 - Curva atuarial de sobrevida global para os 101 pacientes portadores de condrossarcoma.

De acordo com as variáveis clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas, a idade, o status na admissão, o estadiamento segundo ENNEKING (1985), a NOS1 e a NOS2, influenciaram a sobrevida global dos pacientes portadores de condrossarcoma, com $p= 0,024$; $p<0,001$; $p<0,001$; $p=0,007$ e $p<0,001$; respectivamente (Tabela 17).

Tabela 17 - Probabilidade acumulativa de sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com variáveis clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas em 101 pacientes portadores de condrossarcoma.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Global		p (Log rank)
		5 anos (%)	10 anos (%)	
Idade	≤ 30 anos	83,52	78,88	0,024
	31 - 45 anos	63,45	54,70	
	> 45 anos	57,09	48,60	
Localização	Axial	65,57	57,80	0,978
	M. superiores	77,78	66,67	
	M. inferiores	64,65	60,03	
Margens	Livres	74,48	69,89	0,111
	Comprometidas	59,09	46,53	
Status admissão	Loco-regional	73,16	65,09	<0,001
	Loco-regional e à distância	11,11	11,11	
Cirurgias prévias	0	63,45	56,38	0,304
	1	79,41	68,82	
	≥ 2	64,81	64,81	
Situação admissão	Intacto/biopsiado	64,65	56,54	0,160
	Operado	74,63	66,77	
	Qt e/ou Rxt	55,56	55,56	
Grau	I	77,92	77,92	0,608
	II	62,51	56,04	
	III	71,23	54,27	
Est. Enneking	IB	84,62	84,62	<0,001
	IIA	66,67	66,67	
	IIB	71,02	60,88	
	III	11,11	11,11	
NOS1	Negativa	81,58	78,03	0,007
	Positiva	57,54	48,27	
NOS2	Negativa	77,25	75,16	<0,001
	Positiva	47,25	19,69	
NOS3	Negativa	85,00	78,94	0,073
	Positiva	63,31	56,76	
Nitrotirosina	Negativa	86,15	77,54	0,064
	Positiva	60,98	55,44	
CD34	Peritumoral	66,80	59,31	0,581
	Intratumoral	67,76	60,99	
COX-2	Negativa	74,28	67,30	0,143
	Positiva	61,26	55,69	

M.: membros; Qt.: quimioterapia; Rxt.: radioterapia; Est.: estadiamento.

A sobrevida global aos 5 e aos 10 anos para pacientes até 30 anos de idade foram respectivamente de 83,52% e 78,88%; pacientes acima de 30 anos até 45 anos, a sobrevida global aos 5 anos foi de 63,45% e aos 10 anos, de 54,70%; e para os pacientes acima de 45 anos, foi de 57,09% aos 5 anos e 48,60% aos 10 anos ($p=0,024$) (Figura 15).

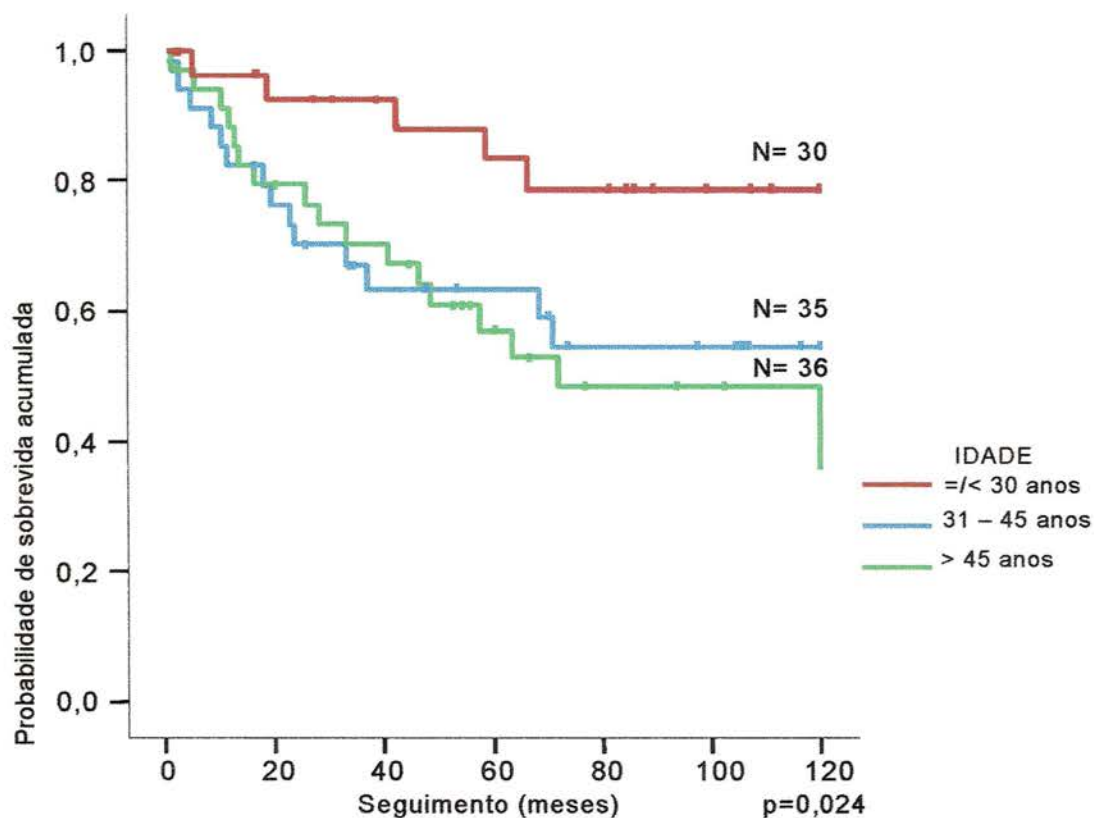


Figura 15 - Curva atuarial de sobrevida global para os 101 pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a idade na admissão.

De acordo com o status do paciente na admissão a sobrevida global aos 5 e aos 10 anos, foram respectivamente de 73,16% e 65,09%, quando a doença era loco-regional e de 11,11% aos 5 e aos 10 anos, quando era loco-regional e à distância ($p < 0,001$) (Figura 16).

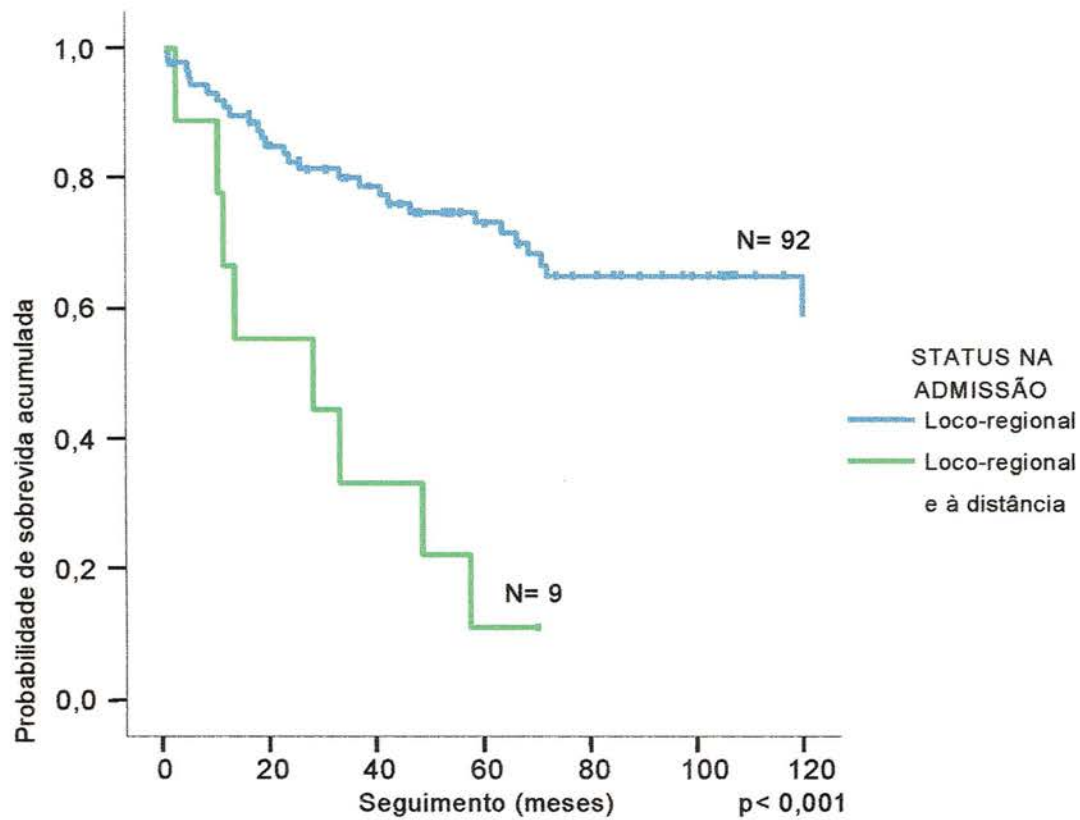


Figura 16 - Curva atuarial de sobrevida global para os 101 pacientes portadores de condrossarcoma de acordo do o status na admissão.

De acordo com o estadiamento de ENNEKING (1985), a sobrevida global aos 5 e 10 anos foram de 84,62% no estágio IB; 66,67% no IIA; 71,02% aos 5 anos e 60,88% aos 10 anos no estágio IIB e de 11,11% aos 5 anos no estágio III (Figura 17).

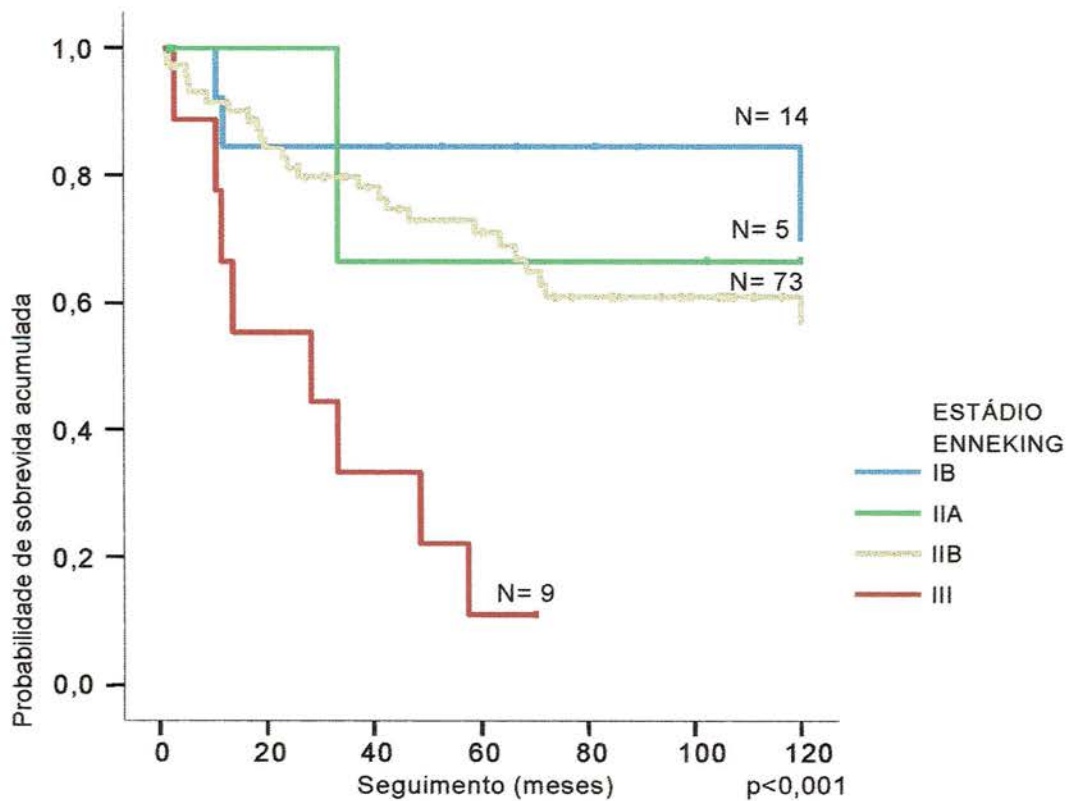


Figura 17 - Curva atuarial de sobrevida global para os 101 pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com o estadiamento segundo a Sociedade de Tumores Musculoesqueléticos.

Em relação à expressão da NOS1, a sobrevida global aos 5 e aos 10 anos foram respectivamente de 81,58% e 78,03% quando negativa; e de 57,54% aos 5 anos e de 48,27% aos 10 anos quando positiva (Figura 18).

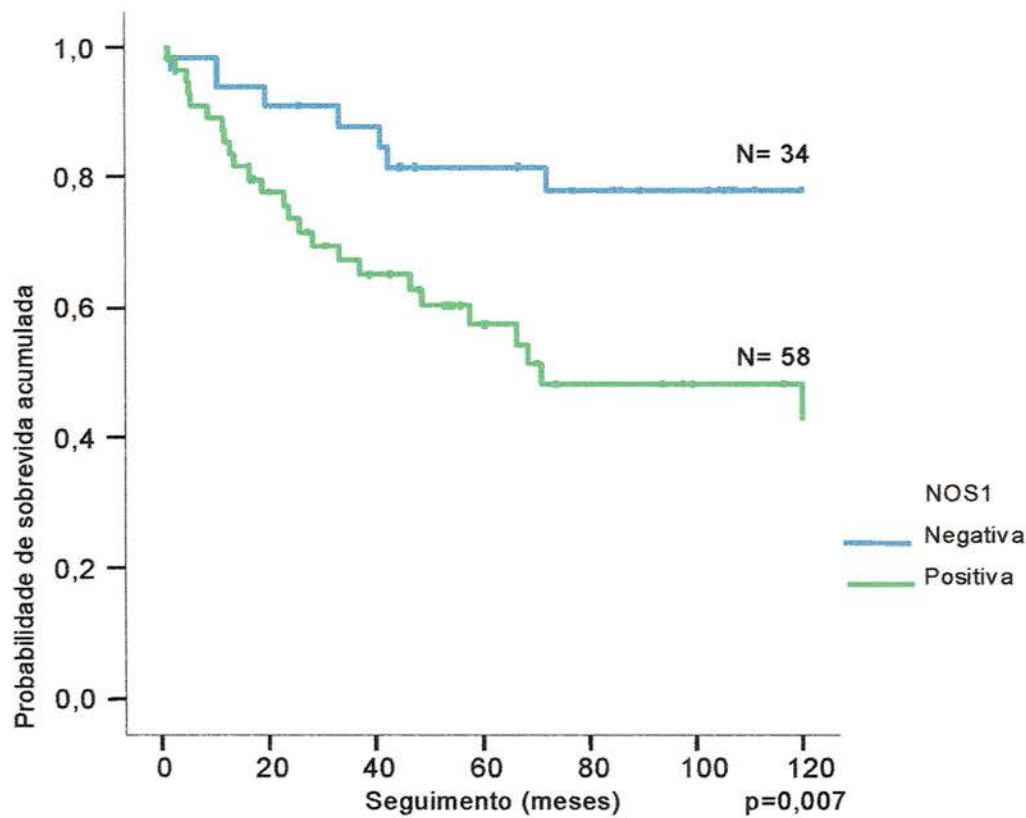


Figura 18 - Curva atuarial de sobrevida global para os 92 pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a expressão imunoistoquímica de NOS1.

De acordo com a expressão da NOS2, a sobrevida global aos 5 e aos 10 anos foram respectivamente de 77,25% e 75,16% quando a expressão estava negativa; e foram de 47,25% aos 5 anos e de 19,69% aos 10 anos quando a expressão estava positiva (Figura 19).

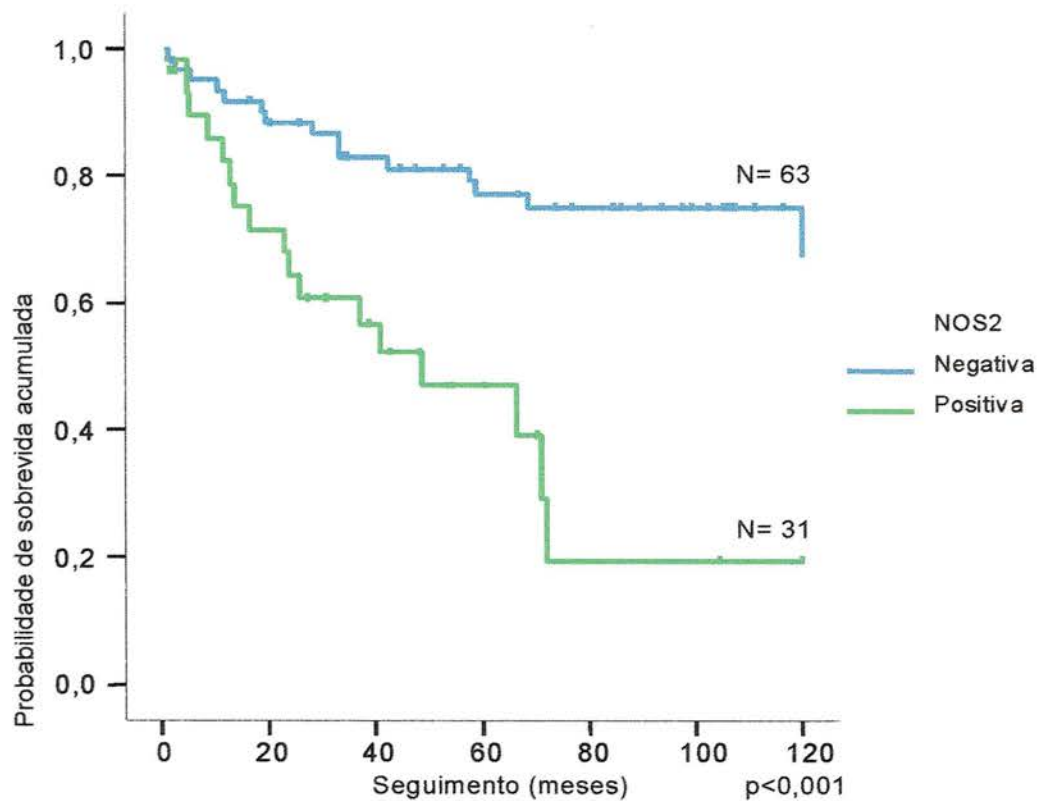


Figura 19 - Curva atuarial de sobrevida global para os 94 pacientes portadores de condrossarcoma de acordo com a expressão imunohistoquímica da NOS2.

4.2.4 Análise multivariada

Após a análise multivariada as margens cirúrgicas e a expressão da NOS2 foram variáveis independentes que estiveram associadas significativamente com menor sobrevida livre de doença local (Tabela 18).

Tabela 18 - Análise multivariada para sobrevida livre de doença local.

Variável	Categoria	RR	IC 95%	p
NOS2	Negativa	1,0	Ref.	0,044
	Positiva	2,5	1,0 – 6,1	
Margens	Livres	1,0	Ref.	0,032
	Comprometidas	2,6	1,1 – 6,2	

As expressões das NOS1 e NOS2 foram variáveis dependentes associadas com menor sobrevida livre de doença metastática. A interação entre as duas variáveis apresentavam significância quando ambas estavam com expressões positivas (Tabela 19 e Figura 20).

Tabela 19 - Análise multivariada para sobrevida livre de doença metastática para a interação das variáveis NOS1 e NOS2.

Variável	Categoria	RR	IC 95%	p
NOS1 e NOS2	Negativa/Negativa	1,0	Ref.	
	Negativa/Positiva ou Positiva/Negativa	2,4	0,4 – 13,1	0,312
	Positiva/Positiva	7,8	1,5 – 39,2	0,013

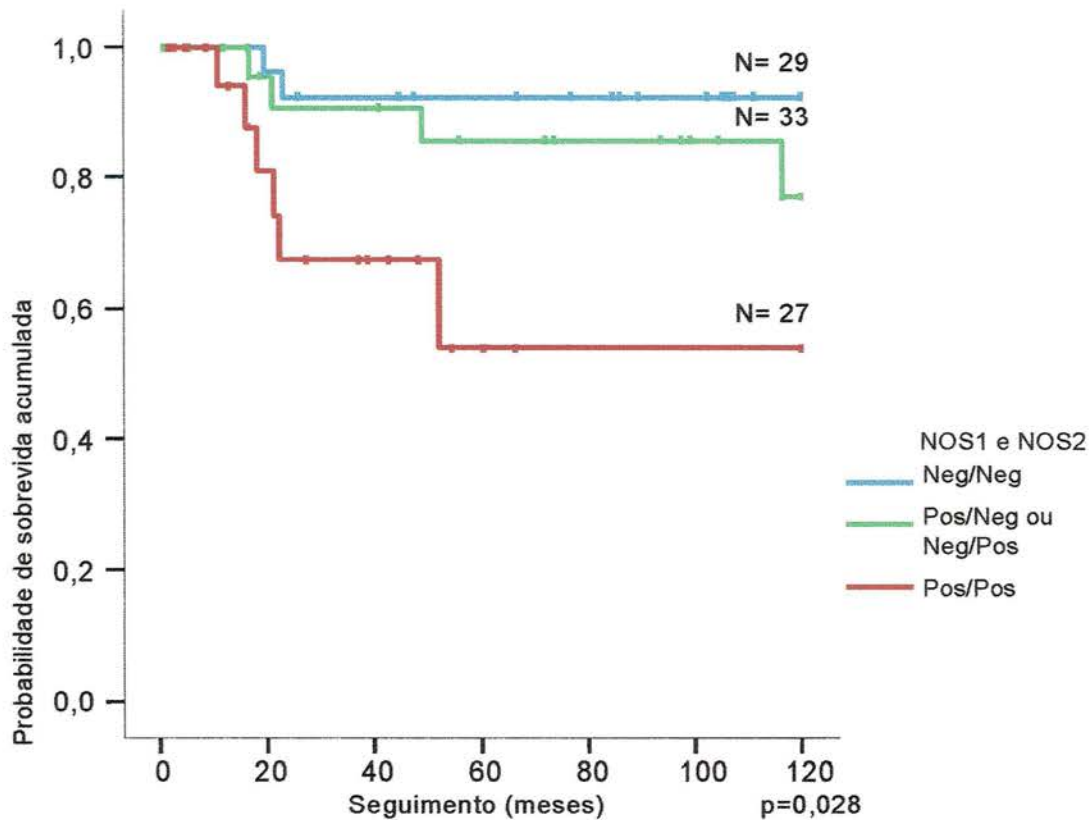


Figura 20 - Curva atuarial de sobrevida livre de doença metastática nos 89 pacientes portadores de condrossarcoma, de acordo com a interação entre NOS1 e NOS2 nos condrossarcomas.

A expressão da NOS2 e o status na admissão foram variáveis independentes que estiveram associados significativamente com menor sobrevida global. A análise da interação entre NOS1 e NOS2 apresentou associação com menor sobrevida global quando pelo menos uma das expressões estava positiva (Tabela 20 e Figura 21).

5 DISCUSSÃO

O prognóstico dos pacientes portadores de condrossarcoma pode ser variável e está baseado na agressividade biológica do tumor (RIZZO et al. 2001). A literatura enfatiza que o sucesso no tratamento desses pacientes depende do diagnóstico acurado e na ressecção completa da lesão (RIZZO et al. 2001; KREICBERGS et al. 1982; DORFMAN e CZERNIAK 1997; BERTONI et al. 2002; DORFMAN et al. 2002). Muitas vezes o desafio está em obter o diagnóstico histológico preciso baseado na biópsia, e que permita o planejamento adequado do tratamento (HEALEY e LANE 1986).

No presente estudo, embora as margens cirúrgicas apresentem associação com a sobrevida livre de doença local, o mesmo não ocorreu com a sobrevida livre de doença metastática e com a sobrevida global, diferentemente dos resultados encontrados por RIZZO et al. (2001), LEE et al. (1999) e GITELIS et al. (1981), porém esses autores consideraram as margens baseadas nos tipos de ressecções cirúrgicas propostas, e não nas margens segundo a avaliação histológica, como foi o caso deste estudo.

O grau histológico esteve associado com a sobrevida livre de doença metastática e global segundo GITELIS et al. (1981); e mostrou ser uma variável independente para a sobrevida livre de doença metastática e sobrevida global no levantamento realizado por LEE et al. (1999). No estudo de RIZZO et al. (2001), não houve associação entre esta variável e a sobrevida livre de doença local, metastática ou global. Entretanto, nesses

três trabalhos, as análises foram realizadas com os graus II e III agrupados. REITH et al. (2003) encontraram associação com a sobrevida global ao avaliar os graus I e II agrupados. No presente estudo, a gradação foi mantida nas 3 escalas, e não houve associação entre a gradação histológica e sobrevida livre de doença local, metastática ou global.

DOI et al. (1996) verificaram a expressão de NOS2 nos tumores sólidos de camundongos. CESARE et al. (1998) observaram que os condrossarcomas de camundongos e de cultura de células de condrossarcoma humano, proveniente de paciente com estadiamento de Enneking IIA, também expressavam NOS2. O presente estudo, demonstra que os condrossarcomas humanos são capazes de expressar NOS1, NOS2 e NOS3; e que essas enzimas podem estar ativas, uma vez que há expressão de nitrotirosina e houve associação estatisticamente significativa entre NOS1, NOS2, NOS3 com a nitrotirosina, com $p= 0,039$; $p=0,045$ e $p<0,001$; respectivamente. Dessa forma, pode haver produção de NO e de peroxinitrito.

DICKENS et al. (2002) mostraram que os osteossarcomas e o tumor de Ewing expressam COX-2. Em concordância com os resultados encontrados por SUTTON et al. (2004) nos condrossarcomas, este trabalho comprova que os condrossarcomas expressam COX-2.

Estudos afirmam que o NO pode estimular a produção da COX-2 (LANDINO et al. 1996; KONG et al. 2002). Segundo KONG et al. (2002), particularmente o NO produzido a partir da NOS2 estaria envolvido neste processo. HARA e OKAYASU (2004) encontraram associação entre COX-2

e NOS2 nos astrocitomas. Este estudo mostra que nos condrossarcomas, além da NOS2, a NOS1 e NOS3 também podem estar envolvidas na estimulação da produção de COX-2, uma vez que houve associação estatisticamente significativa entre COX-2 com NOS1 ($p=0,001$); com NOS2 ($p<0,001$) e com NOS3 ($p<0,001$). Entretanto, este estímulo previamente descrito por LANDINO et al. (1996) através do peroxinitrito, e portanto da nitrotirosina não se confirmou neste estudo, uma vez que não houve associação estatisticamente significativa entre nitrotirosina e COX-2 ($p=0,150$).

De acordo com os resultados de TSUJII et al. (1998) e UEFUJI et al. (1998), a COX-2 e a NOS2 estão relacionados com a angiogênese. HARA e OKAYASU (2004) encontraram associação entre COX-2 e a microcirculação nos astrocitomas, e entre NOS2 e a microcirculação apenas nos astrocitomas de alto grau. KASPER et al. (2004) também encontraram aumento da expressão da COX-2 e NOS2 nos adenocarcinomas de pâncreas, porém sem nenhuma relação com a microcirculação. KONG et al. (2002) apesar de terem encontrado associação entre NOS2 e COX-2, no estudo em adenocarcinomas de pâncreas, não encontraram relação estatisticamente significativa com CD34. O estudo realizado por DOI et al. (1996) com tumores sólidos de camundongos concluíram que existe relação entre expressão de NOS2 e aumento da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo, que resultaria no crescimento tumoral. O estudo realizado por FURUMATSU et al. (2002) com linhagem de células de condrossarcomas de humanos verificou que estas secretam o fator de crescimento vascular

endotelial, que por sua vez, estimulam a proliferação e migração de células endoteliais. No presente estudo, nos condrossarcomas humanos as expressões de COX-2 e NOS2 também estão relacionadas com a microcirculação (CD34), com valor estatisticamente significativo ($p=0,002$ e $p=0,003$; respectivamente). E, a NOS1 e a NOS3 também estão associadas à expressão de CD34 e, portanto com a angiogênese ($p<0,001$ e $p=0,006$; respectivamente). Além disso, a nitrotirosina cuja expressão está relacionada com as NOS, também mostrou associação com CD34 ($p=0,002$).

Porém, a análise da relação desses marcadores com os graus histológicos demonstrou valores estatisticamente significativos apenas com a nitrotirosina, COX-2 e CD34 ($p=0,022$; $p=0,014$ e $p=0,028$; respectivamente). Talvez, as expressões das NOS encontradas nos condrossarcomas sejam apenas suficientes para a produção da nitrotirosina, estímulo da COX-2 e da angiogênese, sem envolvimento direto da NOS com o grau histológico. A associação, entre microcirculação e grau histológico, encontrada neste estudo está de acordo com os resultados encontrados por AYALA et al. (2000). Entretanto, estes autores encontraram vasos intratumorais somente nos condrossarcomas de alto grau, e a densidade dos vasos peritumorais estavam relacionadas com os diferentes graus histológicos. O presente estudo mostra que havia relação entre o grau histológico e a presença de microcirculação intratumoral.

No entanto, nenhum dos marcadores relacionados com os graus histológicos mostrou associação com a sobrevida livre de doença local,

metastática ou global. O que está de acordo com nossos resultados, uma vez que em nossa amostra o grau histológico não mostrou associação com nenhuma das sobrevidas.

DICKENS et al. (2002) ao analisarem a relação entre COX-2 e classificação histológica, estadiamento clínico e sobrevida, nos osteossarcomas e tumor de Ewing, também não encontraram valor estatisticamente significativo naqueles tumores.

Por outro lado, em nosso estudo, a NOS2 mostrou ser uma variável independente associada com menor sobrevida livre de doença local; e quando ela está expressa juntamente com a NOS1, estão associadas com menor sobrevida livre de doença metastática. Diferente dos resultados encontrados por CESARE et al. (1998), em que a NOS2 dos condrossarcomas de camundongos e condrossarcoma humano estágio IIA estariam relacionadas com menor potencial metastático, porém essas conclusões foram baseadas nos condrossarcomas dos camundongos que são tumores bem diferenciados; e o condrossarcoma humano estudado foi proveniente de um único paciente, o qual é insuficiente para tal conclusão.

O estudo de KONG et al. (2002), com pacientes portadores de adenocarcinomas de pâncreas, não encontrou relação da COX-2 e NOS2 com a sobrevida. Em nossa amostra, as expressões das NOS1 e/ou NOS2 estão associadas com menor sobrevida global nos condrossarcomas. EKMEKCIOGLU et al. (2000) também encontraram associação da NOS2 com menor sobrevida nos melanomas metastáticos, e também encontraram

menor sobrevida nos melanomas que expressavam nitrotirosina, o que não se confirmou nos condrossarcomas analisados no nosso estudo.

Segundo AYALA et al. (2000) os vasos peritumorais estariam envolvidos com o crescimento tumoral, enquanto os vasos intratumorais poderiam estar envolvidos com o potencial metastático. Em nosso estudo entretanto, não houve relação entre a microcirculação e as sobrevidas. O estudo da angiogênese em outros tumores ósseos, tumores gigantocelulares (SULH et al. 1996) e osteossarcomas (MANTADAKIS et al. 2001), também não demonstraram essa relação. Esse resultado reforça a afirmação de SULH et al. (1996) de que outros mecanismos não diretamente relacionados com a angiogênese devem estar envolvidos com o seu prognóstico.

5 CONCLUSÕES

1. Os condrossarcomas expressam NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina, COX-2 e CD34;
2. As expressões das NOS1, NOS2 e NOS3 estão relacionadas com a expressão de nitrotirosina nos condrossarcomas;
3. As expressões das NOS1, NOS2 e NOS3 estão relacionadas com a expressão da COX-2 nos condrossarcomas;
4. As expressões das NOS1, NOS2, NOS3, nitrotirosina e COX-2 estão relacionadas com a expressão de CD34 e, portanto com a microcirculação;
5. As expressões da nitrotirosina, COX-2 e CD34 estão relacionadas com os graus histológicos nos condrossarcomas;
6. Relação das expressões dos marcadores com o prognóstico:
 - a. A expressão positiva da NOS2 está associada com menor sobrevida livre de doença local nos condrossarcomas;
 - b. As expressões conjuntas das NOS1 e NOS2 estão associadas com menor sobrevida livre de doença metastática nos condrossarcomas;
 - c. As expressões positivas das NOS1 e/ou NOS2 estão associadas com menor sobrevida global nos condrossarcomas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambs S, Merriam WG, Bennett WP, et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. **Cancer Res** 1998; 58:334-41.

Andrews RG, Singer JW, Bernstein ID. Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. **Blood** 1986; 67:842-5.

Ayala G, Liu C, Nicosia R, Horowitz S, Lachman R. Microvasculature and VEGF expression in cartilaginous tumors. **Hum Pathol** 2000; 31:341-6.

Bertoni F, Bacchini P, Hogendoorn PCW. Chondrosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. **Pathology and genetics tumors of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press; 2002. p.247-51. (World Health Organization Classification of Tumours, 4).

Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. **Biochim Biophys Acta** 1990; 1032:89-118.

Cesare PE, Carlson CS, Attur M, et al. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase and production of nitric oxide by the swarm rat and human chondrosarcoma. **J Orthop Res** 1998; 16:667-74.

Cobbs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA. Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. **Cancer Res** 1995; 55:727-30.

Dickens DS, Kozielski R, Khan J, Forus A, Cripe TP. Cyclooxygenase-2 expression in pediatric sarcomas. **Pediatr Dev Pathol** 2002; 5:356-64.

Doi K, Akaike T, Horie H, et al. Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. **Cancer** 1996; 77:1598-604.

Dorfman HD, Czerniak B. Epidemiology of bone tumors: SEER population – based data, 1973-1987. **Cancer** 1995; 75:223-7.

Dorfman HD, Czerniak B. **Bone tumors**. St. Louis: C V Mosby; 1997. Malignant cartilage tumors; p.353-440.

Dorfman HC, Czerniak B, Kotz R, Vanel D, Park YK, Unni KK. WHO classification of tumours of bone: introduction. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. **Pathology and genetics tumors of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press; 2002. p.226-32. (World Health Organization Classification of Tumours, 4).

Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Smid CM, et al. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. **Clin Cancer Res** 2000; 6:4768-75.

Enneking WF. Staging of musculoskeletal neoplasms. **Skeletal Radiol** 1985; 13:183-94.

Farrell AJ, Blake DR. Nitric oxide. **Ann Rheum Dis** 1996; 55:7-20.

Fina L, Mogaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. **Blood** 1990; 75:2417-26.

Folkman J. What is the evidence that tumours are angiogenesis dependent? **J Natl Cancer Inst** 1990; 82:4-6.

Fujimoto H, Ando Y, Yamashita T, et al. Nitric oxide synthase activity in human lung cancer. **Jpn J Cancer Res** 1997; 88:1190-8.

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.

Geng YU, Blanco FJ, Cornelisson M, Lotz M. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in normal human articular chondrocytes. **J Immunol** 1995; 155:796-801.

Gitelis S, Bertoni F, Picci P, Campanacci M. Chondrosarcoma of bone: the experience at the Istituto Ortopedico Rizzoli. **J Bone and Joint Surg** 1981; 63A:1248-57.

Hajri A, Metzger E, Vallat F, et al. Role of nitric oxide in pancreatic tumour growth: in vivo and in vitro studies. **Br J Cancer** 1998; 78:841-9.

Hara A, Okayasu I. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. **Acta Neuropathol** 2004; 108:43-8.

Healey JH, Lane JM. Chondrosarcoma. **Clin Orthop** 1986; 204:119-29.

Hida T, Yatabe Y, Hiroyuki A, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. **Cancer** 1998; 58:3761-4.

Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. **Proc Natl Acad** 1995; 92:4392-6.

Kasper HU, Kern MA, Drebber U. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic adenocarcinoma: correlation with microvessel density. **World J Gastroenterol** 2004; 10:1918-22.

Kong G, Kim EK, Kim WS, et al. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in pancreatic cancer. **J Gastroenterol Hepatol** 2002; 17:914-21.

Kreicbergs AS, Boquist L, Borssen B, Larsson SE. Prognostic factors in chondrosarcoma: a comparative study of cellular DNA content and clinicopathologic features. **Cancer** 1982; 20:577-83.

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. **Biol Chem Hoppe Seyler** 1995; 376:327-43.

Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. **Proc Natl Acad Sci** 1996; 93:15069-74.

Lee FY, Mankin HJ, Sondren G, et al. Chondrosarcoma of bone: an assessment of outcome. **J Bone Joint Surg Am** 1999; 81:326-38.

Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. **Lancet** 1992; 340:145-6.

Maeda K, Chung YS, Takatsuka S. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. **J Clin Oncol** 1995; 13:477-81.

Mantadakis E, Kim G, Reisch J, et al. Lack of prognostic significance of intratumoral angiogenesis in nonmetastatic osteosarcoma. **J Pediatr Hematol Oncol** 2001; 23:286-9.

McCarthy EF, Freemont A, Hogendoorn PCW. Clear cell chondrosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. **Pathology and genetics tumors of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press; 2002. p.257-8. (World Health Organization Classification of Tumours, 4).

McGough RI, Aswad BI, Terek RM. Pathologic neovascularization in cartilage tumors. **Clin Orthop** 2002; 397:76-82.

Mendes RV, Martins AR, De Nucci G, Murad F, Soares FA. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine immunoreactivity by B-cell non-Hodgkin's lymphomas and multiple myeloma. **Histopathology** 2001; 39:172-8.

Milchgrub S, Hogendoorn PCW. Dedifferentiated chondrosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. **Pathology and genetics tumors of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press; 2002. p.252-4. (World Health Organization Classification of Tumours, 4).

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev** 1991; 43:109-42.

Nakashima Y, Park YK, Sugano O. Mesenchymal chondrosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. **Pathology and genetics tumors of soft tissue and bone**. Lyon: IARC Press; 2002. p.255-6. (World Health Organization Classification of Tumours, 4).

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J** 1992; 6:3051-64.

Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutat Res** 1994; 305:253-64.

O'neal LW, Ackermann LV. Chondrosarcoma of bone. **Cancer** 1952; 5:551-9.

Palmer RMJ, Hickery MS, Charles IG, Moncada S, Bayliss MT. Induction of nitric oxide synthase in human chondrocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 1993; 193:398-405.

Rajnakova A, Goh PM, Chan ST, Ngoi SS, Alponat A, Moochhala S. Expression of differential nitric oxide synthase isoforms in human normal gastric mucosa and gastric cancer tissue. **Carcinogenesis** 1997; 18:1841-5.

Ramani P, Bradley NJ, Fletcher CD. QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium, assessment of its diagnostic utility in paraffin sections. **Histopathology** 1990; 17:237-42.

Reith JD, Horodyski MB, Scarborough MT. Grade 2 chondrosarcoma: stage I or stage II tumor? **Clin Orthop** 2003; 415:45-51.

Rizzo M, Ghert MA, Harrelson JM, Scully SP. Chondrosarcoma of bone: analysis of 108 cases and evaluation for predictor of outcome. **Clin Orthop and Rel Res** 2001; 391:224-33.

Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Otolaryngol Head Neck Surg** 1995; 113:541-9.

Schajowicz F. **Tumores y lesiones pseudotumorales de huesos y articulaciones**. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1982. Tumores malignos formadores de tejido carilaginoso; p.169-214.

Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Forstermann U, Murad F. Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. **Cell Calcium** 1992; 13:427-34.

Singer II, Kawka DW, Scott S, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology** 1996; 111:871-85.

Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. **Histopathology** 2001; 39:179-86.

Sulh MA, Greco MA, Jiang T, Goswami SB, Present D, Steiner G. Proliferation index and vascular density of giant cell tumors of bone-are they prognostic markers? **Cancer** 1996; 77:2044-51.

Sutton KM, Wright M, Fondren G, Towle CA, Mankin HJ. Cyclooxygenase-2 expression in chondrossarcoma. **Oncology** 2004; 66:275-80.

Swana HS, Smith SD, Perrotta PI, Saito N, Wheeler MA, Weiss RM. Inducible nitric oxide synthase with transitional cell carcinoma of the bladder **J Urol** 1999; 161:630-4.

Thomsen LL, Lawton FG, Knowles JE, Riveros-Moreno V, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer **Cancer Res** 1994; 54:1352-4.

Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. **Br J Cancer** 1995; 72:41-4.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Masatsugu H, Dubois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell** 1998; 93:705-16.

Traweek ST, Kandalaf PI, Mehta P, Battifora H. The human hematopoietic progenitor cell antigen (CD34) in vascular neoplasia. **Am J Clin Pathol** 1991; 96:25-31.

Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, Shinomiya N. Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma. **J Surg Oncol** 1998; 69:168-72.

Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyana A, Kinoshita I. Tumor angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. **J Pathol** 1992; 168:257-62.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. **N Engl J Med** 1991; 324:1-8.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred Em, Moore DH. Tumor angiogenesis a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1992; 84:1875-87.

Weidner N, Carrol PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. **Am J Pathol** 1993; 143:401-9.

Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **Blood** 1995; 86:1184-95.

Weninger W, Rendl M, Pammer J, et al. Nitric oxide synthases in Kaposi's sarcoma are expressed predominantly by vessels and tissue macrophages. **Lab Invest** 1998; 78:949-55.

Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. **Cancer Res** 1998; 58:2929-34.

Wolf G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. **Histol Histopathol** 1997; 12:251-61.

Xiao L, Eneroth PH, Qureshi GA. Nitric oxide synthase pathway may mediate human natural killer cell cytotoxicity. **Scand J Immunol** 1995; 42:505-11.

Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, Sukoh N, Watanabe N, Ogura S. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. **Cancer** 1994; 74:2245-50.

Yang J, Kawamura I, Zhu H, Mitsuyama M. Involvement of natural killer cells in nitric oxide production by spleen cells after stimulation with *Mycobacterium bovis* BCG Study of mechanism of the different abilities of viable and killed BCG. **J Immunol** 1995; 155:5728-35.



Anexo 1 – Ficha do Paciente

1. Número do estudo: _____
2. Registro Hospitalar: _____
3. Nome: _____
4. Idade à admissão: _____
5. Profissão: _____
6. Endereço _____ No _____ apto _____
- CEP|_____|_____|_____|_____|_____|_____|_____|_____|
- cidade _____ estado _____
7. Telefone: _____
8. Sexo (1) maculino (2) feminino _____
9. Data de Nascimento _____
10. Grupo étnico (1) branco (2) negro (3) amarelo (99) Ign _____
11. Data da Admissão _____
12. Primeiro Sintoma: _____
- (1) massa/aumento de volume (2) dor (3) restrição funcional
- (4) incidentaloma (5) outro tumor ósseo-cartilaginoso
- (8) outros (99) Ign _____
13. Trauma prévio (1) sim (2) não (99) Ign _____
14. Tratamento prévio não oncológico: _____
- (0) não (1) ATB/AINH/Analgésico/outra medicação (2) FST/calor/gelo
- (3) drenagem (8) outro (99) Ign _____
15. Situação à admissão (tto prévio): _____
- (1) intacto (2) biopsiado (3) operado (4) QT (5) RxT (8) outro (99) Ign _____
16. Situação dos operados fora à admissão (status local) _____
- (1) Tu residual não pode ser avaliado (Rx)
- (2) Sem Tu residual macro (R0)
- (2) Tu residual micro (R1)
- (4) Tu residual macro (R2)(menos de 3 meses)
- (5) Recidiva local (mais de 3 meses)
- (99) não operado fora/Ign _____
17. Conduta nos casos operados fora, sem Tu resid macro (R0) _____
- (1) observação (2) cirurgia (ampliação de margens)
- (99) Não operado fora/Não operado no H.A.C.C./Ign _____
18. Situação à admissão (status da doença) _____
- (1) doença loco-regional (2) doença loco-regional e à distância
- (3) doença à distância sem doença loca(4) recidiva loco-regional
- (99) Ign _____
19. Localização: _____
- (1) cabeça e pescoço (2) úmero (3) ulna (4) rádio
- (5) fêmur (6) tibia (7) fíbula (8) bacia
- (9) coluna (10) mão (11) pé (12) outro (99) Ign _____
20. Segmento ósseo _____
- (0) não aplicável (1) proximal (2) terço médio
- (3) distal (99) Ign _____
21. Localização anatômica _____
- (0) não aplicável (1) epífise (2) metáfise (3) diáfise (99) Ign _____
22. Tamanho do Tu primário (maior eixo): _____cm
- (99) Ign _____
23. Fonte do tamanho do Tu primário _____
- (1) clínica (2) radiológica (3) anatomopatológica (99) Ign _____
24. Tamanho da recidiva (maior eixo): _____cm
- (99) Ign _____

25. Fonte do tamanho da recidiva: _____
 (1) clínico (2) radiológica (3) anatomopatológica (99) Ign
26. Número de cirurgias prévias: _____
 (99) Ign
27. Ressecabilidade no exame loco-regional _____
 (1) ressecável (2) não ressecável (99) Ign/sem tu residual
28. Tto pré-operatório _____
 (1) sim (2) não (99) Ign
29. Operação realizada no H.A.C.C. _____
 (0) não (1) ressecção com substituição parcial
 (2) ressecção com substituição total (3) ressecção com solução biológica
 (4) amputação (5) desarticulação
 (6) curetagem simples (7) curetagem com enxerto
 (8) curetagem com cimento (9) hemipelvectomy interna
 (10) Tikhoff-Linberg (11) ressecção simples (99) Ign
30. Data da cirurgia _____
31. Complicação operatória (até 30 PO) _____
 (0) não (1) locais (infecção/deiscência/coleção/necrose)
 (2) sistêmica (3) óbito
 (99) Ign
32. Tto adjuvante ou complementar: _____
 (1) sim (2) não (99) Ign
33. Recidiva até a data da última consulta _____
 (0) não (1) local (2) distância (99) Ign/primário não tratado
34. Data da recidiva local (para os tratados no H.A.C.C.) _____
35. Tto cirúrgico da recidiva local _____
 (1) ressecção sem amputação (2) ressecção com amputação
 (3) irressecável (8) outro (99) Ign/não recidivou
36. Tto da recidiva local _____
 (0) não tratou (1) cirurgia
 (8) outro (99) Ign/não recidivou
37. Data da detecção da primeira metástase _____
38. Local da metástase _____
 (0) não teve (1) pulmão (2) linfonodos (3) ossos
 (4) fígado (8) outro (99) Ign
39. Tto da metástase _____
 (0) não tratou (1) cirurgia (8) outro (99) Ign/não recidivou
40. Data da última consulta _____
41. Status nesta data _____
 (1) vsed (2) vced (3) moca (4) oc (7) pv
42. Grau de malignidade histológica _____
 (1) baixo grau (2) moderado (3) alto grau (99) Ign
43. Margens AP (relacionado a 1^a. cirurgia no H. A. C. C) _____
 (1) livres (2) Comprometidas (99) Ign/não operado
44. Estádiamo _____
 (1) IA (2) IB (3) IIA (4) IIB (5) III (99) Ign
45. número do AP revisão de lâmina _____
46. número do AP da biópsia _____
47. número da peça _____
48. segundo primário _____
 (0) não (1) sim (99) Ign

Anexo 2 - Planilha dos 101 pacientes portadores de condrossarcoma para identificação nas lâminas de TMA, em duplicata (com o número e/ou letra de identificação da lâmina e em negrito o número do caso correspondente).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	Liver Core	22399 146	40376 145	68285 A 144	74314 C 123	74641 D 137	75032 134	75467 B 158	76940 A 25	79466 26	82243 143	84823 C 148	87614 B 135	103599 A 82	112937 B 109	115544 B 29
2	116706 81	132486 D 124	141065 52	150311 142	151788 78	155016 B 84	161535 131	163055 132	163101 B 118	168645 54	169584 153	176925 88	180843 D 79	205188 A 55	207754 140	
3	214498 B 85	230551 119	234319 60	279756 B 33	287487 A 103	291095 97	293587 A2 117	294592 A 111	295084 C 113	295939 128	304084 104	305373 94	306323 B 36	308795 B 34	310970 102	310981 C 100
4	311721 B 99	311811 B 114	316115 41			321747 E 89	323413 D 90	327043 B 93	331247 92	331730 A 49	335003 A 38	336354 G 44	336372 Q 47	336595 C 48	337150 22	337313 45
5	337521 C 46	337908 A 152	340501 42	340514 A 43	340681 B 24	B97 1323A 2	B97 1956A 39	B97 4396A 17	B97 6627 20	B97 7362 19	B97 8843A 50	B98 1860A 5	B98 6727A 7	B98 6945A1 3	B98 7990B 9	B98 8693B 4
6	B98 9155B 6	B99 390 8	B99 4801 11	B99 6410E 13	B99 7595A 71	B99 8494A 70	BA0 5683F 160	BA0 5945 68	BA0B 7068B 67	BA0 8135B 161	BA0 9395A 69	BA1 2331 162	BA1 2556 66	BA1 5146A 64	BA1 6692A 18	BA1 11905 65
7	BA2 502E 62	BA2 4794A 164	BA2 5030A 63	BA2 5810A 165	BA2 7330A 166	BA3 1406B 167	BA4 229A 168	BA4 1414C 169	BA4 2166B 170							

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	Liver Core	22399 146	40376 145	68285 A 144	74314 C 123	74641 D 137	75032 134	75467 B 158	76940 A 25	79466 26	82243 143	84823 C 148	87614 B 135	103599 A 82	112937 B 109	115544 B 29
2	116706 81	132486 D 124	141065 52	150311 142	151788 78	155016 B 84	161535 131	163055 132	163101 B 118	168645 54	169584 153	176925 88	180843 D 79	205188 A 55	207754 140	
3	214498 B 85	230551 119	234319 60	279756 B 33	287487 A 103	291095 97	293587 A2 117	294592 A 111	295084 C 113	295939 128	304084 104	305373 94	306323 B 36	308795 B 34	310970 102	310981 C 100
4	311721 B 99	311811 B 114	316115 41			321747 E 89	323413 D 90	327043 B 93	331247 92	331730 A 49	335003 A 38	336354 G 44	336372 Q 47	336595 C 48	337150 22	337313 45
5	337521 C 46	337908 A 152	340501 42	340514 A 43	340681 B 24	B97 1323A 2	B97 1956A 39	B97 4396A 17	B97 6627 20	B97 7362 19	B97 8843A 50	B98 1860A 5	B98 6727A 7	B98 6945A1 3	B98 7990B 9	B98 8693B 4
6	B98 9155B 6	B99 390 8	B99 4801 11	B99 6410E 13	B99 7595A 71	B99 8494A 70	BA0 5683F 160	BA0 5945 68	BA0B 7068B 67	BA0 8135B 161	BA0 9395A 69	BA1 2331 162	BA1 2556 66	BA1 5146A 64	BA1 6692A 18	BA1 11905 65
7	BA2 502E 62	BA2 4794A 164	BA2 5030A 63	BA2 5810A 165	BA2 7330A 166	BA3 1406B 167	BA4 229A 168	BA4 1414C 169	BA4 2166B 170							

Anexo 2 - Banco de Dados

Abreviações

- nuid – número do estudo
- idade – grupo de idade na admissão (anos)
 - <30
 - 31-45
 - >45
- sexo –
 - M: masculino
 - F: feminino
- etni – grupo étnico
 - b: branco
 - nb: não branco
 - ig: ignorado
- local – localização do tumor
 - ax: axial
 - ms: membro superior
 - mi: membro inferior
- tam – tamanho do tumor (cm)
 - <5
 - 5 – 10
 - 10 – 15
 - >15
 - ig: ignorado
- siadm – situação na admissão
 - ib: intacto ou com biópsia prévia
 - op: operado fora
 - qr: quimioterapia ou radioterapia prévia
- stadm – status na admissão
 - doença loco-regional
 - doença loco-regional e à distância
- ncir – número de cirurgias prévias
 - 0
 - 1
 - 2/+
- hcacc – tipo de cirurgia no Hospital do Câncer A. C. Camargo -
 - pre: cirurgia preservadora de membro
 - s/p: cirurgia não-preservadora de membro
 - mar: cirurgia marginal ou paliativa
 - ñop: não operado
- marg – margens cirúrgicas
 - lí: livres
 - co: comprometidas
 - ñop: não operado
 - ig: ignorado
- grau – grau histológico
 - 1: grau I ou baixo
 - 2: grau II ou moderado
 - 3: grau III ou alto
- enn – estadiamento pelo sistema de Enneking
 - IA: baixo grau e intracompartimental
 - IB: baixo grau e extracompartimental
 - IIA: alto grau e intracompartimental
 - IIB: alto grau e extracompartimental

- III: qualquer grau e com metástase
- nos1 – expressão da NOS
 - n: negativa
 - p: positiva
 - ig: ignorado
- nos2 – expressão da NOS2
 - n: negativa
 - p: positiva
 - ig: ignorado
- nos12 – interação das expressões de NOS1 e NOS2
 - nn: negativa e negativa
 - pn: negativa e positiva ou positiva e negativa
 - pp: positiva e positiva
 - ig: ignorado
- nos3 – expressão da NOS3
 - n: negativa
 - p: positiva
 - ig: ignorado
- nitro – expressão da nitrotirosina
 - n: negativa
 - p: positiva
 - ig: ignorado
- cox – expressão da COX-2
 - n: negativa
 - p: positiva
 - ig: ignorado
- cd34 – expressão de CD34
 - pe: peritumoral
 - in: intratumoral
- meta – presença de metástase durante o seguimento
 - s: sim
 - n: não
- reci – tipo de recidiva
 - n: não recidivou
 - lo: recidiva local
 - di: recidiva à distância
 - lodi: recidiva local e à distância
 - lmtdg: recidiva local e metástase ao diagnóstico
 - mtdg: metástase ao diagnóstico
 - prntt: tumor primário não tratado
- staf – status final na última consulta
 - vsed: vivo sem doença
 - vced: vivo com doença
 - moca: morte por câncer
 - oc: morte por outras causas
 - pv: perdido de vista
- slmeta – tempo de seguimento livre de doença metastática (meses)
- slloca – tempo de seguimento livre de doença local (meses)
- sobgl – tempo de seguimento global (meses)

Anexo 3 - Banco de dados com as principais características clínicas, cirúrgicas e anatomopatológicas dos 101 pacientes portadores de condrossarcoma.

nuid	idade	sexo	etni	local	tam	siadm	stadm	ncir	hcacc	marg	grau	enn	nos1	nos2	nos12	nos3	nitro	cox	cd34	meta	reci	statf	slmeta	slloca	sobgl
2	>45	F	ig	ms	5-10	ib	lo	0	pre	li	3	IIB	n	n	nn	n	p	n	pe	n	n	vsed	76,88	76,88	76,88
3	>45	F	ig	ax	10-15	op	lodi	1	mar	co	2	III	p	n	pn	ig	ig	n	pe	s	mtdg	vced	.	57,8	57,8
4	31-45	F	ig	ms	10-15	qr	lodi	0	ñop	ñop	2	III	n	n	nn	n	ig	n	pe	s	mtdg	moca	.	10,39	10,39
5	31-45	M	ig	ax	5-10	ib	lo	0	pre	co	3	IIB	p	n	pn	p	ig	p	pe	n	n	vsed	73,82	73,82	73,82
6	>45	M	ig	mi	>15	ib	lo	0	pre	li	1	IB	n	n	nn	p	n	n	pe	n	n	vsed	66,84	66,84	66,84
7	31-45	F	ig	ax	<5	ib	lodi	0	pre	co	3	III	p	p	pp	n	ig	n	pe	s	mtdg	vsed	.	70,33	70,33
8	31-45	M	ig	mi	<5	ib	lo	0	pre	li	2	IIA	p	p	pp	p	p	n	pe	n	n	pv	1,71	1,71	1,71
9	<30	F	ig	mi	5-10	ib	lo	0	mar	co	1	IB	p	p	pp	n	n	p	pe	n	n	pv	42,86	42,86	42,86
11	<30	M	ig	ax	10-15	ib	lo	0	mar	co	2	IIB	n	n	nn	p	p	n	pe	s	lo	moca	19,61	42,24	42,24
13	>45	F	b	mi	>15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	p	pp	p	n	p	pe	n	n	vsed	60,53	60,53	60,53
17	>45	M	ig	ax	10-15	ib	lodi	0	s/p	co	2	III	p	p	pp	p	p	p	in	s	lmtdg	moca	.	4,24	13,68
18	<30	M	b	ax	>15	op	lo	1	pre	li	2	IIB	n	n	nn	n	ig	n	pe	n	lo	vsed	84,67	43,19	84,67
19	31-45	F	ig	ms	10-15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	n	pn	p	p	n	pe	n	n	vsed	97,57	97,57	97,57
20	<30	F	ig	mi	5-10	ib	lo	0	mar	co	1	IB	n	n	nn	n	ig	n	pe	n	n	vsed	89,38	89,38	89,38
22	>45	F	ig	mi	ig	ib	lo	0	ñop	ñop	2	IIB	n	n	nn	n	n	n	pe	n	prntt	pv	2,14	.	2,14
24	31-45	M	ig	ax	10-15	op	lo	1	pre	li	3	IIB	n	p	pn	p	ig	p	pe	n	n	vsed	104,5	104,5	104,5
25	<30	m	ig	mi	>15	op	lo	1	s/p	li	2	IIB	n	n	nn	p	ig	n	pe	n	n	vsed	298	298	298
26	31-45	m	b	ax	>15	ib	lo	0	s/p	li	2	IIB	n	p	pn	p	p	p	pe	n	n	oc	0,76	0,76	0,76
29	<30	m	ig	ms	5-10	op	lo	1	s/p	li	3	IIB	p	p	pp	p	p	p	in	n	n	vsed	363,9	363,9	363,9
33	>45	f	ig	ax	5-10	op	lo	2/+	pre	ig	2	IIB	p	n	pn	p	ig	p	pe	s	lodi	pv	16,74	11,41	20,39
34	31-45	m	ig	ax	>15	op	lo	2/+	s/p	li	2	IIB	n	n	nn	p	ig	p	pe	n	lo	vsed	175,2	39,9	175,2
36	31-45	m	ig	mi	5-10	op	lo	1	pre	ig	1	IB	p	n	pn	p	p	n	pe	n	n	vsed	141,6	141,6	141,6
38	<30	m	ig	ax	>15	op	lo	2/+	s/p	li	2	IIB	n	n	nn	p	ig	n	pe	n	n	vsed	107,1	107,1	107,1
39	<30	f	ig	mi	<5	op	lo	2/+	mar	co	2	IIB	n	n	nn	n	p	n	pe	n	n	vsed	85,86	85,86	85,86
41	31-45	f	ig	mi	10-15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	n	n	nn	p	p	n	pe	n	n	vsed	132	132	132

nuid	idade	sexo	etni	local	tam	siadm	stadm	ncir	hcacc	marg	grau	enn	nos1	nos2	nos12	nos3	nitro	cox	cd34	meta	reci	staff	slmeta	sloca	sobgl
42	>45	f	b	mi	<5	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	n	n	nn	n	n	n	pe	n	n	vsed	102,5	102,5	102,5
43	>45	f	ig	ax	>15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	n	pn	p	n	p	in	n	n	vsed	93,75	93,75	93,75
44	>45	m	ig	mi	>15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	p	pp	p	ig	ig	pe	s	lodi	moca	18,09	14,18	25,99
45	31-45	m	b	mi	5-10	ib	lo	0	pre	co	3	IIB	n	n	nn	n	p	n	pe	n	n	vsed	105,7	105,7	105,7
46	31-45	m	nb	mi	>15	ib	lodi	0	s/p	li	3	III	p	p	pp	p	p	p	in	s	mtdg	moca	.	11,71	11,71
47	31-45	f	ig	ms	5-10	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	n	n	nn	n	n	n	pe	n	n	vsed	107	107	107
48	>45	m	ig	ax	>15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	n	pn	n	n	n	pe	n	n	pv	2,89	2,89	2,89
49	31-45	m	ig	mi	>15	ib	lo	0	pre	ig	2	IIB	n	n	nn	n	n	n	pe	n	lo	vsed	105	8,13	105
50	31-45	f	ig	ax	ig	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	p	pp	p	p	n	pe	s	lodi	moca	16,28	16,28	70,99
52	>45	m	b	ax	<5	ib	lo	0	ñop	ñop	2	IIB	p	p	pp	p	p	p	pe	n	n	moca	12,93	12,93	12,93
54	<30	f	ig	ax	ig	ib	lo	0	ñop	ñop	1	IB	p	p	pp	ig	p	ig	in	n	prntt	pv	2,66	.	2,66
55	>45	m	ig	ax	10-15	qr	lo	0	s/p	li	1	IB	ig	n	ig	p	p	ig	pe	s	di	moca	206,1	234	234,1
60	<30	m	ig	ax	>15	op	lo	1	pre	li	1	IB	n	n	nn	ig	ig	p	pe	n	n	vsed	217,8	217,8	217,8
62	31-45	m	nb	mi	>15	ib	lo	0	pre	li	3	IIB	ig	n	ig	p	ig	n	pe	n	n	vsed	33,88	33,88	33,88
63	>45	m	ig	ax	10-15	qr	lodi	0	pre	li	2	III	p	n	pn	n	n	n	pe	s	lmtdg	moca	.	8,03	28,49
64	31-45	f	b	ax	5-10	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	n	n	nn	n	ig	n	pe	n	n	vsed	47,5	47,5	47,5
65	<30	m	b	ax	10-15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	p	pp	p	p	p	in	n	n	vsed	38,91	38,91	38,91
66	>45	f	ig	ax	ig	op	lo	2/+	pre	ig	2	IIB	n	n	nn	n	p	n	pe	n	n	vsed	44,9	44,9	44,9
67	31-45	f	ig	ax	5-10	ib	lo	0	pre	co	3	IIB	p	p	pp	p	p	p	in	n	lo	moca	4,93	3,78	4,93
68	31-45	m	b	ax	10-15	qr	lo	0	pre	li	3	IIB	p	p	pp	p	p	p	in	s	lodi	vced	52,27	45,59	53,45
69	45>	m	b	mi	5-10	op	lo	1	pre	li	1	IB	p	n	pn	p	ig	n	pe	s	di	vced	48,98	52,86	52,86
70	31-45	m	b	mi	>15	ib	lo	0	pre	co	3	IIB	p	p	pp	p	p	p	pe	n	lo	moca	37,24	6,45	37,24
71	31-45	m	ig	ax	>15	qr	lodi	0	pre	li	2	III	p	n	pn	p	p	n	pe	s	lmtdg	moca	.	11,41	33,39
78	<30	f	b	ax	5-10	ib	lo	0	s/p	li	2	IIB	n	n	nn	p	n	n	pe	n	n	vsed	187	187	187
79	<30	f	b	mi	ig	op	lo	1	s/p	li	1	IB	p	n	pn	p	p	n	pe	n	n	vsed	124,5	124,5	124,5
81	>45	f	b	ax	5-10	op	lo	1	pre	ig	1	IB	ig	i	ig	ig	ig	n	pe	n	lo	moca	10,72	7,2	10,72
82	>45	m	b	ax	<5	op	lo	1	mar	co	3	IIB	n	p	pn	p	ig	p	pe	n	lo	moca	72,01	65,82	72,01
84	>45	f	b	mi	>15	ib	lo	0	pre	ig	2	IIB	p	i	ig	p	ig	p	pe	n	n	oc	46,58	46,58	46,58

nuid	idade	sexo	etni	local	tam	siadm	stadm	ncir	hcacc	marg	grau	enn	nos1	nos2	nos12	nos3	nitro	cox	cd34	meta	reci	statf	slmeta	sloca	sobgl
85	<30	m	nb	mi	>15	ib	lo	0	s/p	li	3	IIB	p	n	pn	p	p	p	in	n	n	pv	16,81	16,81	16,81
88	31-45	f	nb	ax	ig	qr	lodi	0	s/p	li	2	III	p	n	pn	p	p	ig	pe	s	mtdg	moca	2,83	2,83	
89	31-45	f	b	ax	<5	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	n	pn	p	n	p	pe	n	n	vsed	116,5	116,5	116,5
90	<30	m	nb	mi	10-15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	p	pp	p	p	n	in	n	n	pv	27,4	27,4	27,4
92	<30	m	b	ax	5-10	op	lo	1	pre	li	2	IIB	n	n	nn	n	n	n	pe	n	lo	vsed	111,3	46,15	111,3
93	<30	m	nb	ax	10-15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	n	pn	p	p	n	in	n	n	vsed	99,28	99,28	99,28
94	>45	f	nb	ax	<5	op	lo	1	pre	co	2	IIB	n	n	nn	n	n	n	pe	n	lo	vsed	158	19,8	158
97	31-45	m	nb	mi	ig	ib	lo	0	s/p	li	3	IIB	p	p	pp	p	p	n	in	s	di	moca	21,25	23,19	23,19
99	<30	m	b	ax	>15	op	lo	1	pre	ig	2	IIB	ig	n	ig	ig	ig	ig	pe	n	lo	moca	58,88	48,82	58,88
100	>45	m	b	mi	>15	op	lo	2/+	s/p	co	3	IIB	p	n	pn	p	p	p	in	n	lo	moca	5,76	3,91	5,76
102	>45	f	b	mi	ig	op	lo	1	pre	li	1	IB	p	n	pn	p	p	p	in	n	n	vsed	124,4	124,4	124,4
103	<30	f	b	ax	ig	ib	lo	0	pre	co	2	IIB	ig	n	ig	p	ig	n	pe	n	n	vsed	162,7	162,7	162,7
104	31-45	m	b	mi	ig	op	lo	1	ñop	ñop	2	IIB	p	p	pp	p	p	p	pe	s	di	moca	10,95	23,88	23,88
109	>45	m	b	ms	<5	qr	lo	0	pre	li	2	IIB	p	n	pn	p	p	n	in	s	lodi	moca	116,4	81,74	156,5
111	31-45	m	nb	ms	ig	ib	lo	0	pre	co	2	IIB	p	n	pn	p	n	n	pe	s	lodi	moca	20,95	14,93	68,62
113	>45	m	b	ms	5-10	ib	lo	0	pre	li	2	IIA	n	n	nn	n	ig	n	pe	s	lodi	moca	23,03	23,39	33,42
114	<30	m	b	ax	5-10	ib	lo	0	pre	li	1	IB	ig	i	ig	ig	ig	ig	pe	n	n	vsed	81,28	81,28	81,28
117	<30	m	b	ax	5-10	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	n	i	ig	n	ig	n	pe	n	n	vsed	393,8	393,8	393,8
118	>45	m	b	ax	>15	ib	lo	0	pre	co	2	IIB	p	p	pp	p	p	n	in	n	n	moca	16,48	16,48	16,48
119	31-45	f	b	ax	>15	ib	lo	0	s/p	li	2	IIB	n	n	nn	p	p	n	pe	n	lo	moca	19,8	14,61	19,8
123	31-45	m	b	ax	<5	ib	lo	0	pre	ig	2	IIA	n	n	nn	p	p	n	pe	n	n	vsed	437,2	437,2	437,2
124	>45	f	b	ms	10-15	ib	lo	0	s/p	li	2	IIB	p	n	pn	p	p	p	in	n	n	vsed	214,6	214,6	214,6
128	<30	f	b	ax	ig	op	lo	2/+	pre	li	2	IIB	n	n	nn	n	n	n	pe	n	n	vsed	147,9	147,9	147,9
131	>45	m	b	ax	>15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	n	pn	p	p	n	pe	n	n	vsed	290,2	290,2	290,2
132	<30	m	b	ax	ig	qr	lo	0	s/p	li	1	IB	p	n	pn	p	p	n	in	n	n	vsed	292,6	292,6	292,6
134	<30	m	b	mi	<5	op	lo	1	s/p	li	3	IIB	n	n	nn	p	p	n	pe	n	n	vsed	344	344	344
135	45>	f	b	mi	ig	ib	lo	0	s/p	li	3	IIB	p	n	pn	p	p	p	pe	n	n	oc	1,58	1,58	1,58
137	<30	m	b	mi	5-10	ib	lo	0	s/p	li	2	IIB	p	n	pn	p	p	p	pe	n	n	oc	18,78	18,78	18,78

nuid	idade	sexo	etni	local	tam	siadm	stadm	ncir	hcacc	marg	grau	enn	nos1	nos2	nos12	nos3	nitro	cox	cd34	meta	reci	staf	slmeta	sloca	sobgl
140	>45	f	b	ms	5-10	ib	lo	0	s/p	li	1	IIB	p	n	pn	p	p	n	in	n	n	oc	12,01	12,01	12,01
142	>45	f	b	mi	ig	op	lo	1	ig	li	2	IIB	p	n	pn	p	p	n	pe	n	n	vsed	312,1	312,1	312,1
143	<30	m	b	ax	ig	ib	lo	0	ñop	ñop	3	IIA	p	p	pp	p	p	p	in	n	n	pv	2,83	2,83	2,83
144	<30	f	b	ax	ig	ib	fo	0	mar	co	2	IIB	p	p	pp	p	p	p	in	n	n	moca	5,46	5,46	5,46
145	>45	f	b	mi	<5	ib	lo	0	s/p	li	2	IIB	ig	i	ig	ig	ig	ig	pe	n	n	oc	63,75	63,75	63,75
146	>45	m	nb	mi	ig	op	lo	2/+	s/p	li	2	IIB	n	p	pn	p	p	n	pe	n	n	oc	41,02	41,02	41,02
148	31-45	m	ig	ax	ig	op	lo	1	pre	li	2	IIB	n	n	nn	p	p	n	in	n	n	vsed	207,7	207,7	207,7
152	45>	f	b	ax	10-15	ib	lodi	0	pre	li	1	III	p	p	pp	p	n	n	pe	s	mtdg	moca	.	48,52	48,52
153	31-45	m	b	ax	>15	ib	lo	0	ñop	ñop	2	IIB	p	p	pp	p	p	p	pe	n	n	moca	8,98	8,98	8,98
158	31-45	m	b	ax	10-15	op	lo	2/+	pre	li	2	IIB	ig	i	ig	p	ig	ig	pe	n	lo	moca	18,22	10,63	18,22
160	>45	f	b	ax	<5	ib	lo	0	pre	li	3	IIB	p	n	pn	p	p	n	pe	n	n	vsed	55,99	55,99	55,99
161	>45	f	b	ax	ig	qr	lo	0	pre	li	2	IIB	p	p	pp	p	p	p	in	n	n	vsed	54,57	54,57	54,57
162	31-45	f	b	ax	ig	ib	lo	0	mar	co	3	IIB	p	p	pp	p	p	p	in	n	lo	vsed	48,13	2,99	48,13
164	31-45	m	b	ax	10-15	ib	lo	0	pre	li	3	IIB	ig	n	ig	p	p	p	in	n	n	vsed	34,8	34,8	34,8
165	>45	m	b	ax	>15	ib	lo	0	pre	co	2	IIB	p	n	pn	p	p	p	in	n	lo	vsed	140,1	107,9	140,1
166	<30	f	b	ax	10-15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	p	pp	p	p	p	pe	s	lodi	vced	22,4	22,43	30,92
167	31-45	f	nb	ax	5-10	ib	lo	0	pre	li	3	IIB	n	n	nn	p	p	p	pe	n	n	vsed	25,92	25,92	25,92
168	31-45	m	b	ax	>15	ib	lo	0	pre	li	2	IIB	p	n	pn	p	n	p	pe	n	n	pv	16,41	16,41	16,41
169	<30	f	b	ax	5-10	op	lo	1	pre	ig	3	IIB	p	p	pp	n	p	n	in	n	lo	moca	66,35	59,11	66,35
170	<30	m	b	ax	5-10	ib	lo	0	pre	ig	2	IIB	p	i	ig	p	ig	n	pe	n	n	vsed	17,24	17,24	17,24

