

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS DE ADESÃO CELULAR CD44v6,
CD44/HCAM, E-CADERINA E PAN-CADERINA E SUA
CORRELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO
EM PACIENTES PORTADORES DE
CONDROSSARCOMA**


Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuminari
Coordenadora Pós-Graduação

LUCÍOLA ASSUNÇÃO ALVES

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

Co-Orientadores:

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Dr. Fábio de Oliveira Ferreira

**EXEMPLAR
ESPECIAL**

São Paulo
2005

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Alves, Lucíola Assunção

Estudo da expressão das proteínas de adesão celular CD44V6, CD44/HCAM, e-caderina e pan-caderina e sua correlação com o prognóstico em pacientes portadores de condrossarcoma / Lucíola Assunção Alves. -- São Paulo, 2005.

69p.

Dissertação (mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Ademar Lopes.

Descritores: 1. CONDIROSSARCOMA. 2. CARTILAGEM.
3. ADESAO CELULAR. 4. INTEGRINAS. 5. CADERINAS.
6. PROTEINA ATIVADORA CALCIO DEPENDENTE.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Ademar Lopes, meu orientador, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr Fernando Augusto Soares, pela paciência, disposição e boa vontade, o meu muito obrigada.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Ferreira, pela contribuição no planejamento do protocolo para coleta de dados, sugestões valiosas nos momentos difíceis e orientação criteriosa nas análises deste trabalho.

À Dra Isabela Werneck da Cunha, por se envolver e se mostrar sempre muito atenciosa e acessível em todos os momentos.

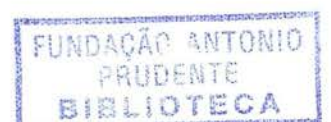
À Dra Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami, obrigada pela ajuda com o programa de computação e ajuste no banco de dados.

À Sra Hirde Contesini e a todos os funcionários do SAME pela atenção dispensada na fase de levantamento de dados.

À Sra Suely Francisco, Sra Rosinéia Aguiar Carneiro, Sra Francyne Pólen de Lima, e Srta Janaína Beltrane dos Santos, pelo carinho, atenção e eficiência na viabilização do material bibliográfico.

À Inês Nobuko Nishimoto, pela amizade e por acreditar na minha capacidade primeiramente e pela contribuição valiosa na análise estatística.

À Ana Maria Kuniari, pela acolhida carinhosa e incentivo em toda jornada da pós-graduação.



A todos os colegas do Departamento de Cirurgia Pélvica.

À Erika Maria Monteiro, pela colaboração no banco de dados e principalmente nos conhecimentos em computação.

À FAPESP pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

Alves LA. **Estudo da expressão imunoistoquímica das proteínas de adesão celular CD44v6, CD44/H-CAM, E-caderina e Pan-caderina e sua correlação com o prognóstico em pacientes portadores de condrossarcoma.** São Paulo; 2005. Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O objetivo do presente trabalho foi estudar a expressão imunoistoquímica das proteínas de adesão celular CD44v6, CD44/H-CAM, E-caderina e Pan-caderina e avaliar sua correlação com variáveis clínicas e anatomopatológicas selecionadas, visando identificar fatores prognósticos relacionados à sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG) em pacientes portadores de condrossarcoma. A preparação das lâminas foi feita pela técnica de "tissue microarray". A expressão imunoistoquímica foi considerada positiva para reações com $\geq 10\%$ de células tumorais marcadas. Noventa pacientes admitidos no Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer da Fundação Antônio Prudente de São Paulo entre 1953 e 2000 foram elegíveis para o estudo. O cálculo dos estimadores atuariais de sobrevida foi feito pela técnica de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevida comparadas pelos testes de Log Rank. As associações entre as variáveis foram feitas por testes de qui-quadrado e teste exato de Fisher. A análise multivariada foi feita pela técnica de regressão logística com modelo de risco proporcional de Cox e a validade estatística estabelecida para valores de $p < 0,05$. Ao final da atualização de dados, 43 pacientes (47,8%) encontravam-se vivos sem evidência de doença; 8 (8,9%) vivos com doença em atividade; 29 (32,2%) faleceram de câncer; e para 10 (11,1%) não foi possível informação atual da condição clínica. Verificou-se expressão de CD44v6 em 52,4% das amostras e de Pan-caderina em 80,7%. Observou-se ausência de expressão de CD44/H-CAM e E-caderina em 100% das amostras. A expressão de CD44v6 se correlacionou com o grau histológico, sendo verificada maior expressão nas amostras de condrossarcoma de graus

moderado e alto. Os fatores adversos para sobrevida livre de doença na análise univariada foram: idade acima de 30 anos ($p=0,0213$), margem microscópica comprometida ($p=0,0001$) e grau histológico moderado ou alto ($p=0,0034$). No modelo multivariado, os mesmos fatores foram considerados variáveis independentes relacionadas a maior risco de recidiva: alto grau de malignidade (RR=2,28; IC95%, 1,1 – 5,4) e moderado (RR=2,55; IC95%, 1,1-6,2); margem comprometida (RR=3,08; IC95%, 1,5–6,4); idade acima de 37 anos (faixa etária em duas categorias em função do pequeno número de eventos; RR=2,35; IC95%, 1,1–4,9). Para a sobrevida global, as variáveis estudadas não influenciaram o risco de óbito, pois os fatores estudados não atingiram níveis de significância para os valores de $p<0,05$. As proteínas de adesão celular estudadas não foram consideradas variáveis de valor prognóstico para sobrevida livre de doença e sobrevida global em portadores de condrossarcoma.

SUMMARY

Alves LA. [Study of immunohistochemistry expression of cellular adhesion proteins CD44v6, CD44/HCAM, E-cadherin, Pan-cadherin and correlation with prognosis in chondrosarcoma]. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The main purpose of this study was the immunohistochemistry proteins of cellular adhesion molecules, CD44/HCAM, CD44v6, E-cadherin and pan-cadherin to evaluate its correlation with selected clinical and anatomopathological variables aiming to identify prognostic value, related to disease free survival and overall survival in chondrosarcoma. The preparation of the slides was made by the technique of tissue microarray. The immunohistochemistry expression was considered positive for reactions $\geq 10\%$ of tumoral cells. This study included 90 patients registered in the pelvic surgery department in Centro de Tratamento e Pesquisa, from Cancer hospital, São Paulo, between 1953 and 2000. Survival curves, 5-year and 10-year survival rates were calculated using the Kaplan-Meier method. Survival curves were compared using the log-rank test. Cox proportional hazards model was used for multifactorial analysis. Tables and proportions were analyzed using the χ^2 test and Fisher exact test. Statistical significance was defined as a p value less than 0,05. At the end of the study, Forty-three patients (47,8%) were alive without disease evidence; eight (8,9%) live tumor activity and twenty-nine died of their disease. The expression of CD44v6 was found in 52,4% and 80,7% for pan-cadherin. The CD44/H-CAM and E-cadherin were not expressed in all patients. The expression of CD44v6 was correlated with histologic grade, mainly in moderate and high grades. Negative prognostic factors for disease free survival in univariate analysis were: age > 37 years ($p=0,0213$), positive microscopic margin ($p=0,0001$) and high and moderate histological grade ($p=0,0034$). The same variables were important for multivariate analysis and were independent concerning

recurrence: high grade (RR= 2,28; IC 95%, 1,5-6,4); moderate grade (RR=2,55; IC95%, 1,1-6,2) ; positive microscopic margin (RR=3,08; IC95%, 1,5-6,4); age above 37 year (2 categories by the small number of events; RR= 2,35; IC 95%, 1,1-4,9). For overall survival the variables were not significant to death, because the p value for the factors were less than 0,05. Adhesion proteins studied were not considered variables to prognostic in disease free survival and overall survival in chondrosarcoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático mostrando a adesão célula-célula promovida pela caderina, com sua porção extracelular, transmembrana e intracelular.	15
Figura 2	Desenho esquemático mostrando a estrutura da integrina e sua relação com a membrana celular e meio extracelular	17
Figura 3	Fotomicrografia mostrando o resultado negativo para a reação imunoistoquímica para o marcador CD44/HCAM	38
Figura 4	Fotomicrografia mostrando o resultado positivo para a reação imunoistoquímica para o marcador CD44v6	38
Figura 5	Fotomicrografia mostrando o resultado negativo para a reação imunoistoquímica E-caderina	39
Figura 6	Fotomicrografia mostrando o resultado positivo para a reação imunoistoquímica para o marcador Pan-caderina	39
Figura 7	Curva da sobrevida livre de doença em meses para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma.	42
Figura 8	Curva da sobrevida livre de doença em meses para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma segundo o grupo etário.	43
Figura 9	Curva da sobrevida livre de doença em meses para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma segundo o grau de malignidade histológica.	44
Figura 10	Curva de sobrevida livre de doença em meses para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma segundo a avaliação microscópica das margens de ressecção.	44
Figura 11	Curva de sobrevida livre de doença em meses para 84 pacientes portadores de condrossarcoma segundo a expressão imunoistoquímica de CD44v6.	45

Figura 12 Curva de sobrevida livre de doença em meses para 88 pacientes portadores de condrossarcoma segundo a expressão imunohistoquímica de Pan-caderina.	46
Figura 13 Curva de sobrevida global em meses para 90 pacientes portadores de condrossarcoma.	49
Figura 14 Curva de sobrevida global em meses para 84 pacientes portadores de condrossarcoma segundo a expressão imunohistoquímica de CD44v6.	49
Figura 15 Curva de sobrevida global em meses para 88 pacientes portadores de condrossarcoma segundo a expressão imunohistoquímica de pan-caderina.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição do anticorpo primário, clones, título de diluição e fabricantes.	31
Tabela 2	Número e percentual de pacientes segundo características clínicas e demográficas, para os pacientes portadores de condrossarcomas	33
Tabela 3	Distribuição dos 90 pacientes portadores de condrossarcoma segundo o tipo de cirurgia realizada.	33
Tabela 4	Taxa de sobrevida local e metástases para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma.	34
Tabela 5	Situação clínica dos 90 pacientes portadores de condrossarcoma ao final da análise.	34
Tabela 6	Resultado da expressão imunoistoquímica de CD44v6 e Pan-caderina em amostras de condrossarcoma.	37
Tabela 7	Taxa de sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos e 10 anos para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma.	41
Tabela 8	Risco de recidiva em pacientes portadores de condrossarcoma – Modelo multivariado por variáveis selecionadas	42
Tabela 9	Taxas de sobrevida global (SG) em 5 e 10 anos para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma.	47
Tabela 10	Estudo da correlação entre a expressão imunoistoquímica de CD44v6 e Pan-caderina e o grau histológico em amostras de Condrossarcoma.	50

LISTA DE ABREVIATURAS

E-CAD	Caderina epitelial
MEC	Matriz extra celular
N-CAD	Caderina neural

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Justificativa para o estudo	1
1.2	Revisão da literatura	6
1.2.1	Condrossarcoma	6
1.2.2	Aspectos biomoleculares	9
1.2.2.1	Caderinas	13
1.2.2.2	Pan-Caderina	16
1.2.2.4	Integrinas	17
1.2.2.5	CD44	19
1.2.2.6	CD44/H-CAM	21
1.2.2.7	CD44v6	21
2	OBJETIVOS	23
3	CASUÍSTICA E MÉTODO	24
3.1	Método	24
3.1.1	Crerios de elegibilidade	24
3.1.2	Variáveis estudadas	25
3.1.3	Crerios de avaliação das variáveis	25
3.1.4	Preparo das lâminas	27
3.1.5	Imunoistoquímica	29
3.2	Casuística	31
3.2.1	Dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos	31
3.2.2	Dados de seguimento	34
3.3	Análise estatística	35
3.4	Parecer da Comissão de Ética	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Expressão das variáveis moleculares	37



Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

4.2	Fatores prognósticos relacionados à sobrevida livre de doença	40
4.3	Fatores prognósticos relacionados à sobrevida livre global	45
4.4	Análise da correlação entre a expressão de CD44v6 e Pan-caderina com o grau histológico	49
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 JUSTIFICATIVA PARA O ESTUDO

Os tumores primários do sistema esquelético são raros, correspondendo a 0,2% de todos os cânceres (JEMAL et al. 2004). O condrossarcoma representa de 13,3% a 15,8% dos tumores malignos primários ósseos (KRICUN 1993), sendo o terceiro mais freqüente no adulto, superado pelo mieloma e pelo osteossarcoma.

Alguns aspectos clínicos e anatomopatológicos sabidamente correlacionam-se com o prognóstico de pacientes portadores de condrossarcoma, sendo o grau histológico um fator relevante (O'NEAL e ACKERMANN 1952). Os condrossarcomas são divididos em três categorias segundo o grau de malignidade histológica, considerando-se principalmente arquitetura tecidual e anaplasia celular: grau I (bem diferenciados), grau II (moderadamente diferenciados) e grau III (pouco diferenciados). Aproximadamente 90% dos condrossarcomas são de graus baixo ou intermediário e apresentam comportamento indolente, com baixo potencial metastático. Somente 5% a 10% são lesões de grau III, com alto potencial metastático. Existem, no entanto, tumores de baixo grau com grande poder de disseminação (DORFMAN e CZERNIAK 1997), provavelmente em função de características biológicas ainda não identificadas.

O tratamento mais efetivo para os condrossarcomas graus I e II é a cirurgia oncológica (MARCOVE 1977), com ressecção em monobloco,

incluindo a cicatriz de biópsia e as partes moles comprometidas, com margem em tecidos sãos. Quando inadequadamente operados, evoluem com recidivas locais, cuja progressão pode resultar na impossibilidade de ressecção e/ou desenvolvimento de metástases. Para o condrossarcoma grau III, assim como para os tumores mesenquimais e desdiferenciados, preconiza-se a realização de quimioterapia neoadjuvante.

Além do grau histológico, o tamanho da lesão e a localização anatômica têm sido associados ao prognóstico (MARCOVE et al. 1972; EVANS et al. 1977, GITELIS et al. 1981, KREICBERGS et al. 1982). O risco de recorrências é associado ao aumento do grau histológico, que determina um comportamento clínico mais agressivo. Também o risco de desenvolvimento de metástases é associado ao grau histológico, sendo o pulmão o órgão mais freqüentemente acometido. No entanto, apesar de classificados como portadores de lesões grau I, um crescimento não controlado com evolução fatal é observado em 10% das vezes (KREICBERGS et al. 1982; DORFMAN e CZERNIAK 1997), uma vez mais sugerindo que outros fatores, além do grau de malignidade histológica, devam ser importantes para determinação do comportamento biológico e do prognóstico.

As interações entre células e entre estas e a matriz extracelular (MEC), são essenciais para a organização dos tecidos nos organismos multicelulares. Várias estruturas associadas à membrana plasmática contribuem para a coesão e a comunicação entre as células. Durante a transformação e progressão neoplásicas ocorrem alterações na produção,

deposição e degradação da MEC (HIROHASHI 1998), que surgem em função de alterações na resposta estromal. A mudança na expressão de ligantes da MEC pode fazer com que células tumorais não respondam aos limites epigenéticos impostos pela MEC. Durante a progressão tumoral torna-se evidente a importância da ação supressora exercida pelo microambiente, e o principal modulador dessa supressão é a MEC. Assim, os componentes da MEC exercem um papel fundamental na determinação da orientação e morfologia celulares.

O fenômeno de adesão celular é em parte devida à ação coesiva dos membros de uma família de glicoproteínas transmembrana chamadas caderinas. É um fenômeno importante tanto nos processos biológicos quanto nas condições patológicas, e participa ativamente na regulação da diferenciação, proliferação e apoptose celular. Sabe-se que o tecido cartilaginoso se origina do mesênquima, que deriva do mesoderma e que as células mesenquimais primitivas estão imersas em uma MEC abundante e viscosa, e dão origem ao tecido cartilaginoso. Portanto, alterações nos processos de adesão célula-célula, célula-MEC e nas moléculas de adesão podem estar relacionadas com o fenótipo tumoral e metastático.

As conexões entre moléculas de adesão, integrinas e caderinas conferem estabilidade aos tecidos. Tem-se associado a perda ou alteração dessas proteínas ao aumento do potencial metastático (CAALLARO 2001). A polaridade celular, assim como a organização durante a adesão e a migração das células são controladas pela interação destas com as proteínas da MEC através da família das integrinas, e com as outras células

através das caderinas. A ativação de receptores de superfície celular transmite sinais para o interior das células e conduz seu comportamento.

Vários tipos de moléculas de adesão celular estão implicadas no processo de transformação neoplásica. Algumas dessas moléculas têm sua produção aumentada durante esse processo, facilitando, por exemplo, a adesão da célula tumoral às células endoteliais (CAALLARO e CHRISTOFORI 2001). Algumas moléculas, como as caderinas, têm a sua expressão diminuída ou alterada, o que facilita a evasão da célula tumoral do seu sítio primário. Por exemplo, demonstrou-se que a perda ou diminuição da expressão de E-caderina pode estar associada ao maior risco de invasão e metástases nos mais diversos tipos de tumores (VLEMINCKX et al. 1991).

Alguns membros da família das caderinas e cateninas estão envolvidas na condrogênese, e mutações genéticas na catenina foram detectadas em tumores malignos ósseos. Interações do complexo catenina-caderina são importantes na regulação das atividades celulares e anormalidades na expressão ou função deste complexo podem ser importantes para o desenvolvimento e comportamento clínico dos tumores ósseos (MONAGHAN et al. 2001).

A expressão de E-caderina está freqüentemente diminuída nos carcinomas pouco diferenciados altamente invasivos e um aumento da expressão é capaz de reduzir sua capacidade invasiva. Assim, a perda da expressão ou da função de E-caderina parece ser um importante passo na progressão tumoral.

O CD44 é uma glicoproteína multiestrutural de superfície celular que está envolvida em diversas atividades, incluindo interação célula-matriz, migração celular, apresentação de fatores de crescimento, citocinas, e transmissão de sinal da superfície celular para o interior, levando a apoptose, sobrevivência celular ou proliferação. Nas neoplasias, o CD44 permite a migração das células metastáticas do tecido primário para órgãos remotos. Expressão aumentada do antígeno CD44 foi encontrada em alguns carcinomas e isto sugere que a transição das linhagens tumorais de não metastáticas para metastáticas pode estar associada com mudanças na expressão de variantes do antígeno CD44.

Em muitos tumores malignos a expressão de CD44 ou de seu variante CD44v6 tem sido associado com o prognóstico. A significância clínica do CD44 em sarcomas de partes moles foi estudada em 133 pacientes e a expressão da variante CD44v6 foi verificada em 57% dos casos. Nestes pacientes, a forte expressão do marcador estava associada com tumores de baixo grau de malignidade ($p=0,04$), e a expressão alta do marcador, com um risco maior para a recorrência local. A baixa expressão do marcador se correlacionou com uma sobrevida pobre ($p=0,02$) (MAULA et al. 2001).

Apesar das neoplasias cartilaginosas de baixo grau de malignidade consistirem tipicamente de cartilagem do tipo hialina, algumas delas também apresentam regiões fibrocartilaginosas. Levando-se em consideração que o CD44, um receptor de superfície celular para o hialuronato, é identificado na cartilagem, demonstrou-se que sua variante v6 (CD44v6) foi identificada nas

camadas médias e profundas da cartilagem normal, mas somente nas regiões de cartilagem tipo hialina nos condrossarcomas, não sendo localizado nas regiões fibrocartilaginosas, sugerindo o que a falta da expressão de CD44v6 pode estar relacionada com a alteração tecidual fenotípica em regiões fibrocartilaginosas (BOSCH et al. 2002).

A participação das moléculas de adesão celular no processo de transformação e progressão neoplásica em portadores de condrossarcoma ainda não foi estudada e constitui, portanto, uma alternativa de pesquisa que pode contribuir para o entendimento do comportamento biológico e da história natural da doença.

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1 Condrossarcoma

O condrossarcoma é definido como um tumor maligno primário do osso, caracterizado pela formação de cartilagem neoplásica a partir das células tumorais, podendo apresentar componente mixóide, calcificação ou ossificação (CAMPANACCI et al. 1975; DURIGHETTO JUNIOR et al. 1994). Mesmo quando apresenta áreas de ossificação, não tem osteóide neoplásico ou osso oriundo diretamente do estroma sarcomatoso, sendo o tecido ósseo conseqüente a uma metaplasia endocondral. As calcificações intralesionais observadas se devem a alterações regressivas no condrossarcoma.

As primeiras descrições do condrossarcoma como tumor ósseo se devem a Keiller em 1925 e a Phemister em 1930, citados por SCHAJOWICZ (2000, p.212). Desde o início, encontrou-se dificuldade em se diferenciar um osteossarcoma condroblástico de um condrossarcoma. LICHTENSTEIN e JAFFE, em 1943, foram os primeiros a fazer uma distinção clara entre estes dois tumores. O encondroma (tumor cartilaginoso benigno) pode se transformar em um condrossarcoma, porém a comprovação deste evento é difícil (JAFFE 1958; DAHLIN 1976).

O condrossarcoma ocorre mais em indivíduos do sexo masculino, com uma razão 1,5: 1,0. A faixa etária mais acometida se situa entre a quarta, quinta e sexta décadas da vida, com pico de incidência na sexta década (BERTONI et al. 2002). Raramente acomete crianças e adultos após a oitava década da vida.

Os condrossarcomas primários podem ser divididos em: convencional (central), desdiferenciado, mesenquimal, de células claras, e periférico (SCHAJOWICZ et al. 1972). Mais de 90% são classificados como convencional ou central (UNNI 1996). A localização preferencial é na bacia, principalmente no osso ilíaco. Outros locais incluem o fêmur (proximal e distal), úmero proximal e costelas (HUVOS 1991). Em um osso longo, a localização anatômica preferida é a metafisária, mas pode se estender à região metadiafisária ou mais raramente à epífise. Apesar de sua localização predominantemente óssea, pode ter apresentação extra-óssea e em partes moles. Os sintomas mais freqüentemente referidos são dor e aumento de

volume local, que devem ser valorizados no diagnóstico diferencial com lesões benignas, geralmente assintomáticas.

Macroscopicamente, o condrossarcoma apresenta arquitetura lobulada, composta de nódulos hialinos translúcidos e que lembram uma cartilagem normal. A natureza lobulada da lesão é acentuada por uma mineralização mais intensa na periferia, que apresenta uma coloração opaca branco-acinzentada ou granular amarelada. Pode ser vista uma área de ossificação encondral extensa focal, de coloração mais escura. Pode-se encontrar uma região amolecida e mixomatosa, com ou sem área de hemorragia ou necrose. Nas lesões de baixo grau e grau intermediário, nota-se área de cartilagem madura, mas no centro pode-se encontrar áreas císticas. A presença de coloração mais acinzentada, friabilidade e hemorragia favorecem o diagnóstico de lesão agressiva. Nos ossos longos, a cavidade medular é em grande parte ocupada por cartilagem lobulada, com a cortical espessada e osso reativo externamente. O endóstio pode apresentar-se com erosão. Lesão tumoral nas partes moles adjacentes pode ser observada, com tendência a englobar o osso circunferencialmente (SCHAJOWICZ 1972).

Microscopicamente o condrossarcoma é uma neoplasia que produz tecido cartilaginoso com os condrócitos irregularmente dispostos em meio à matriz hialina, com áreas mixóides. Caracteriza-se pela variabilidade de aspectos, em quaisquer de suas formas (ACKERMANN e SPJUT 1962; PRÓSPERO 2001). As células tumorais se assemelham a condrócitos normais e encontram-se dispostas em espaços lacunares, embebidas em

matriz cartilaginosa hialina que pode estar parcialmente calcificada, ser mixóide, ou exibir foco de calcificação endondral (McFARLAND et al. 1971). A quantidade de mineralização pode variar nas diferentes lesões e também em diferentes áreas do mesmo tumor. A estrutura dos lóbulos varia em tamanho, indo desde 1 milímetro até muitos milímetros de diâmetro. O nódulo individual pode ser separado por uma estreita banda fibrovascular, e na periferia pode ser visto permeando os espaços medulares e englobando as trabéculas ósseas esponjosas.

1.2.2 Aspectos Biomoleculares

As funções da MEC, uma rede macromolecular de proteínas estruturais fibrilares embebidas em um gel de polissacarídeos, vão desde a modulação da morfologia celular e proliferação; atuação como um substrato no qual as células podem aderir; e até como um reservatório de fatores de crescimento. A MEC está conectada ao núcleo da célula através de uma rede de proteínas que inclui moléculas de adesão transmembrana e o citoesqueleto (HIROHASHI 1998).

A organização celular tecidual também pode ser feita através da adesão direta célula-célula (ALBERS et al. 2002), como por exemplo nos tecidos epiteliais. Se levarmos em consideração os tecidos epitelial e o conjuntivo, teremos dois exemplos onde a função, da MEC e da adesão célula-célula são muito diferentes. O tecido conjuntivo, do ponto de vista estrutural, é dividido em três componentes: células, fibras e substância fundamental. O principal constituinte deste tecido é a matriz extracelular

(MEC). No tecido conjuntivo as células estão esparsas e distribuídas numa matriz rica em polímeros fibrosos e substância fundamental, que suportam a maior parte do estresse mecânico sofrido pelo tecido. Por substância fundamental entende-se um complexo viscoso e altamente hidrofílico de macromoléculas aniônicas (glicosaminoglicanos e proteoglicanos) e glicoproteínas multiadesivas (laminina, fibronectina) que se ligam a proteínas receptoras, as integrinas, presentes na superfície das células, bem como a outros componentes da matriz, fornecendo força tênsil e rigidez à matriz. A interação maior se faz entre a célula e componentes da MEC, e não entre célula-célula. A fibronectina e a laminina parecem participar de modo importante no desenvolvimento dos tecidos embrionários. Elas também aumentam a habilidade de células neoplásicas cancerosas em invadir outros tecidos. Já no tecido epitelial, as células apresentam uma intensa adesão mútua e, para separá-las, são necessárias forças mecânicas relativamente grandes. As células estão unidas em camadas, o epitélio, e a MEC é composta de uma fina camada denominada lâmina basal, localizada sob a camada celular. Portanto o tecido é formado basicamente por células, que suportam a maior parte do estresse mecânico e a adesão é, em parte, devida à ação coesiva das caderinas (ALBERS 2002).

Como vimos, a adesão celular é importante tanto nos processos biológicos quanto nas condições patológicas, e participa ativamente na regulação da diferenciação, proliferação e apoptose celular, portanto podemos considerar além do efeito sinalizador, o morfogenético.

A metástase é um processo onde uma célula, ou um grupo de células, é capaz de deixar o tumor primário, alcançar os tecidos adjacentes, sobreviver em sítios secundários e proliferar no sítio metastático. Uma porcentagem das células tumorais circulantes da ordem de 0,01% dá origem a uma nova metástase, sinalizando que a metástase é um evento competitivo altamente seletivo, e que favorece a sobrevivência de uma subpopulação de células metastáticas pré-existentes no tumor primário (CAALLARO 2001).

As células metastatizantes necessitam primeiramente migrar do tumor primário e atravessar barreiras teciduais, o que pode ocorrer através da migração da célula pelo estroma intersticial, ou necessitar de penetração e proteólise de obstáculos teciduais. A segunda etapa deste processo se inicia após a sobrevivência das células na corrente sanguínea e adesão nos leitos capilares de órgãos à distância. Essa etapa inclui o extravasamento, no qual as células deixam o lúmen do vaso e atingem um novo ambiente, originando as micrometástases que progressivamente se tornarão tumores secundários.

Como mencionado anteriormente, a membrana basal e o estroma intersticial constituem a matriz extracelular, o principal tecido conectivo que separa compartimentos orgânicos. A perda da continuidade da membrana basal é um indicador de malignidade nos carcinomas (BOSCH 2002). Os estudos moleculares nos permitem entender melhor esses eventos. A primeira ocorrência na ativação do sprouting das células tumorais é a alteração da interação adesiva com suas membranas basais e também das células que interagem com a membrana basal vascular ou linfática exposta.

A seguir observa-se a migração dessas células em resposta a fragmentos de proteínas da MEC ou citocinas.

As formas de adesão célula-célula, célula-MEC e moléculas de adesão que possam estar relacionadas com o fenótipo tumoral e metastático serão comentados a seguir.

As junções ancoradoras permitem a ligação dos elementos do citoesqueleto de uma célula ao citoesqueleto de outra célula ou à MEC e podem ser de três tipos: junções aderentes, desmossomos e hemidesmossomos (COOPER 2003).

As junções aderentes célula-célula conectam os filamentos de actina ao citoplasma cortical de células adjacentes, formando um cinto de adesão contínuo. Nos cintos de adesão, as células ficam diretamente justapostas e as membranas plasmáticas, unidas por proteínas transmembrana de ligação, membros de uma grande família de moléculas de adesão célula-célula dependentes de íons cálcio, as caderinas. No interior da célula os filamentos de actina se ligam ao cinto de adesão através de proteínas intracelulares: α -catenina, β -catenina, γ -catenina, vinculina e α -actinina, logo, os feixes de actina são ligados via caderinas e proteínas de ligação.

Nas junções aderentes célula-matriz, ocorre a conexão da actina com as proteínas da MEC, em regiões especializadas da membrana, chamadas de placas de adesão. As proteínas de ligação transmembrana, que atuam como ponte entre os filamentos de actina intracelulares e a MEC, são membros de uma grande família de receptores para proteínas da MEC, as integrinas. Essas moléculas ligam-se indiretamente à actina através de

um complexo de proteínas de ligação que inclui talina, α -actinina e vinculina, e diretamente a um componente protéico da MEC (COOPER 2003).

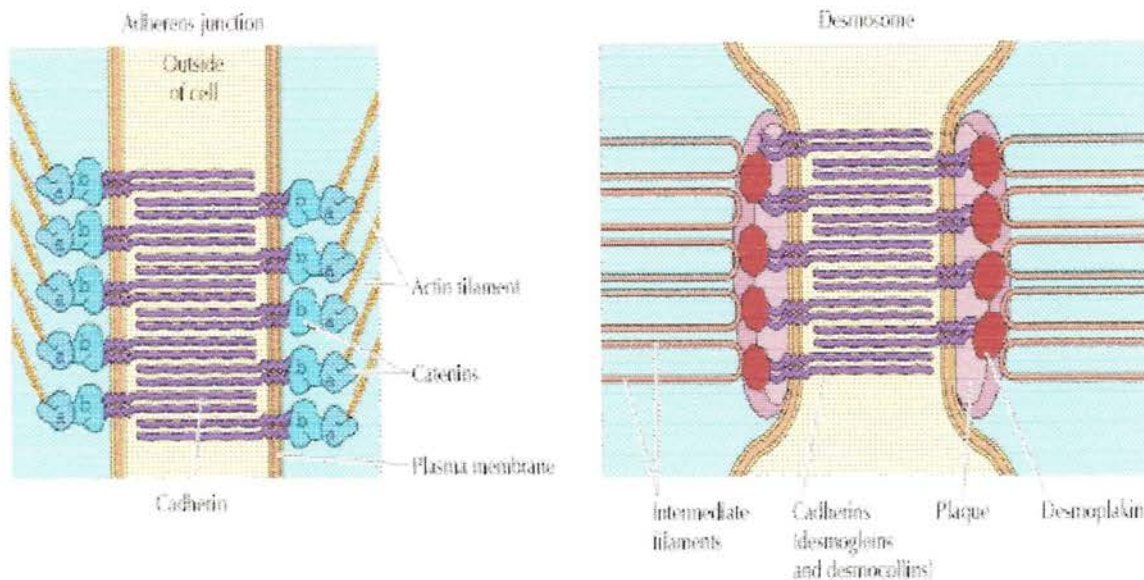
Os desmossomos são pontos de contato intercelular responsável pela ligação entre os filamentos intermediários de células adjacentes, fixando-as e formando uma rede através do tecido. Há um complexo de proteínas intracelulares responsáveis pela ligação do citoesqueleto às proteínas de adesão transmembrana envolvidas, as caderinas.

Os hemidesmossomos unem a superfície basal das células à lâmina basal subjacente, integrando os filamentos intermediários. Semelhante à placa de adesão, as proteínas de ligação transmembrana envolvidas nos hemidesmossomos pertencem à família dos receptores de MEC, as integrinas.

1.2.2.1 Caderinas

As caderinas constituem uma grande família de glicoproteínas, em sua maior parte de membrana, que promovem a adesão célula-célula e cujos membros possuem em comum uma porção extracelular, envolvida em interações homofílicas proteína-proteína (VLEMINCKX 1991). São cálcio dependentes e encontradas em praticamente todos os tecidos. As caderinas perdem a sua capacidade de promover adesividade na ausência de cálcio. São divididas em epitelial (E-caderina), placentária (P-caderina), molécula de adesão da célula hepática (L-CAM) e neural (N-caderina). Sua molécula possui uma porção extracelular, uma transmembrana e uma intracelular. A parte polipeptídica é a extracelular e contém o sítio de ligação com o cálcio.

Na ausência do cálcio, as caderinas sofrem uma alteração conformacional e são rapidamente degradadas por enzimas proteolíticas (GION 2002). Já foram identificadas mais de 100 membros desta família até o momento. As caderinas são as principais moléculas de adesão dos epitélios. Fazem parte de dois tipos de estruturas de adesão célula-célula: 1) junções de aderência: as moléculas de caderina se ligam a filamentos de actina através das cateninas. As caderinas clássicas caracterizam-se por possuir um domínio citoplasmático altamente conservado e pela capacidade de formar complexos através de interações muito específicas com proteínas intracelulares denominadas cateninas (BIRCHMEIER e BEHRENS 1994); e 2) desmossomos, quando as caderinas (desmogleínas e desmocollinas) se ligam a filamentos intermediários através de outras moléculas que não as cateninas, denominadas de desmoplaquina. A mais importante diferença com relação às caderinas clássicas é o fato de que o domínio citoplasmático não interage com as cateninas, mas com um grupo diferente de proteínas citoplasmáticas que podem ser a desmoplaquina, placofilina e placoglobina (ROWLANDS et al. 2000; CONACCI-SORRELL et al. 2003). Qualquer quebra no complexo intracelular caderina E - cateninas pode causar perda da adesão celular (KAJIMA et al. 1999).



Fonte: COOPER e HAUSMAN (2003).

Figura 1 - Desenho esquemático mostrando a adesão célula-célula promovida pela caderina, com sua porção extracelular, transmembrana e intracelular.

1.2.2.2 E-Caderina

A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana de 120kDa e está envolvida na adesão célula-célula. No domínio extracelular, ela está envolvida com a adesão célula-célula através de interações cálcio dependente, enquanto que no seu domínio intracelular, a E-caderina se conecta com a actina do citoesqueleto através das cateninas. O gen foi localizado no cromossomo 16q22.1. Ela assume um papel crítico na regulação da formação das junções de adesão nos epitélios. O complexo E-caderina/catenina está associada com a adesão na membrana cortical tanto na zona de aderência quanto na placa de adesão lateral. A tirosinafosforilação pode romper este complexo, levando a mudanças nas propriedades adesivas (SELL 1991).

1.2.2.3 Pan-Caderina

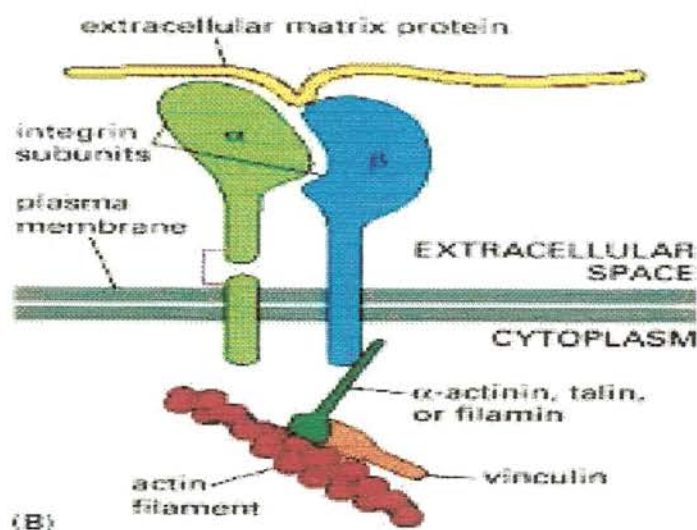
A Pan-caderina é um composto de E-caderina (epitelial), P-caderina (placentária), N-caderina (neural) e L-CAM (hepática).

A anti-Pan-caderina foi desenvolvida em coelho usando-se um peptídeo sintético correspondente ao C-terminal do amino ácido de galinha N-caderina com um resíduo de lisina extra N-terminal (24 aminoácidos) pareados com glutaraldeído para liberar o complexo de hemocianina (KLH) como unidade imunogênica.

A região N-terminal destas moléculas está exposta na superfície externa da célula e contém o sítio de ligação homofílico ativo. Ele é acompanhado por uma seqüência transmembrana típica e usualmente, uma cauda citoplasmática C-terminal que media interações com o sistema microfilamentar, através de moléculas como as cateninas, plakoglobinas, vinculina, e α -actinina. As caderinas estão implicadas em processos morfogenéticos, de sinalização intercelular, invasão tumoral e metástase. Este amplo espectro de anticorpos Pan-caderina, reativos com o C-terminal da N-caderina, detecta múltiplas caderinas em humanos, bovinos, caninos, aves, anfíbios e células teciduais (GION 2002). Seu uso tem por objetivo a demonstração de junções de aderência célula-célula pelo subtipo específico da caderina. Estudos específicos para a Pan-caderina em condrossarcomas não foram localizados.

1.2.2.4 Integrinas

As integrinas pertencem à grande família de glicoproteínas transmembranas que atuam como receptores para várias glicoproteínas da matriz extracelular ou da superfície celular. Possuem uma subunidade alfa de 140-180 kD e uma subunidade beta de 105-125 kD, formando heterodímeros (KAWANO 2004). A família pode ser formada de 25 pareamentos distintos das subunidades alfa e beta. Cada integrina consiste de uma unidade α e uma unidade β , cada uma com um domínio extracelular, um domínio de membrana e uma cauda citoplasmática. Cada pareamento é específico para uma série de ligantes. Por exemplo, a integrina $\alpha\beta3$ interage com várias moléculas da ECM (matriz extra celular), incluindo fibronectina, fibrinogênio, colágeno, e laminina, enquanto que a integrina $\alpha5\beta1$, por exemplo interage seletivamente com a fibronectina (BAST 2000).



Fonte: COOPER e HAUSMAN (2003).

Figura 2 - Desenho esquemático mostrando a estrutura da integrina e sua relação com a membrana celular e meio extra celular.

As integrinas são glicoproteínas cálcio dependentes e sua interação com ligantes fixados à superfície promove a adesão de fagócitos, diapedese e fagocitose. São os principais receptores na célula animal para ligação entre as proteínas da matriz extracelular (colágeno, fibronectina) e a célula. A ligação mecânica entre as integrinas e o citoesqueleto poderia explicar a conversão da força mecânica em sinais bioquímicos (ROSENBERG 1999). Estão intimamente relacionadas com o processo de extravasamento leucocitário, agregação plaquetária e cicatrização tecidual. A β 1-integrina (CD29) media a adesão do condrócito à matriz cartilaginosa e já foi pesquisada como modelo experimental para o estudo de reparo tecidual em osteoartrose.

As integrinas estão envolvidas nas atividades das enzimas proteolíticas que degradam a membrana basal, que é a barreira inicial à invasão. A membrana basal funciona como um suporte para as células e é composta de uma série de proteínas da ECM, incluindo a laminina, colágeno e proteoglicanos. A rotura da organização da membrana basal possivelmente é o marcador histológico do carcinoma invasivo. As células tumorais produzem, ativam e liberam diversos tipos de proteases que clivam moléculas da ECM (ALBERS 2002). A degradação da membrana basal requer a expressão de proteases que são específicas da ECM, por exemplo, dois membros da família da matriz de metaloproteinases (MMP): a MMP-2 e a MMP-9 que possuem atividade contra o colágeno tipo IV, que é o principal constituinte da membrana basal. As integrinas podem estar envolvidas na ativação de MMPs específicas. As integrinas são essenciais para a migração

celular e invasão, não apenas por que elas mediam a adesão à ECM, mas também porque regulam vias que sinalizam a organização do citoesqueleto. Durante a migração, as células estão constantemente fazendo e quebrando contatos com integrinas. Dependendo da composição da ECM, as integrinas ativam uma ou mais vias de sinalização intracelular. Esses sinais regulam o comportamento celular em um microambiente tecidual complexo. A adesão da célula às moléculas da ECM através de heterodímeros de integrina é uma exigência fundamental para que a célula adquira a tração necessária para movimentar-se. As integrinas não apenas enviam sinais à célula em resposta ao ambiente extracelular, mas também respondem aos sinais intracelulares. Este processo regula a adesividade das integrinas através da modulação da afinidade das integrinas pelos ligantes da ECM, regulando a invasão e migração celulares. Para que as células invadam e migrem para os tecidos distantes, elas devem ter a habilidade de ativar mecanismos que previnam a apoptose (BERTONI 2002). A ligação das integrinas com os ligantes da ECM iniciam uma série de sinais pró-sobrevivência que previnem a apoptose.

1.2.2.5 CD44

O N-terminal da molécula de CD44 forma um domínio globular, ou três subdomínios globulares. A região conservada do N terminal do domínio extracelular, a região transmembrana e a cauda citoplasmática, apresentam pelo menos 85% de homologia entre as espécies (FOX 1994). A região da membrana proximal tem 35% de homologia e a região variável tem 65% de

homologia. A isoforma CD44 pode ser gerada por splicing (um processo onde o RNA mensageiro é editado para a remoção das sequências não codificadoras) alternativo de 9 exons, que são inseridos entre duas regiões constantes que consistem em 5 e 4 éxons nas extremidades da molécula (ALBERS 2002). No entanto, o número de variantes identificadas até o momento é de aproximadamente uma dúzia, a maioria detectada em células epiteliais, keratinócitos, leucócitos ativados e células tumorais. O splicing direto do éxon 5 ao 16 (pulando todos os éxons variantes), gera CD44 expresso em células mesenquimais e em células hematopoiéticas. Além do splicing alternativo, modificações pós-translacionais através da glicosilação e incorporação de glicosaminoglicanos modificam a proteína, permitindo grande variação na sua expressão e funções (BOSCH 2002). O ácido hialurônico é o principal ligante do CD44, mas outros componentes da matriz extracelular (ECM) tais como colágeno, fibronectina, fibrinogênio, laminina, sulfato de condroitina, osteopontina, I-selectina, e-selectina também possuem essa propriedade. Esta variedade de ligantes se deve à sua variedade estrutural. Em alguns casos o CD44 só interage com o ligante a partir de um estímulo externo. Existem três estados de ativação da CD44 identificados em células normais:

- o CD44 ativo, que se liga ao ácido hialurônico;
- o CD44 induzido, que não se liga ao ácido hialurônico, ou se liga de forma fraca, desde que ativado por anticorpos monoclonais, citocinas, fatores de crescimento ou éster forbol;

- CD44 inativo, que não se liga ao ácido hialurônico, mesmo na presença de agentes indutores. O envolvimento do CD44 em atividades patológicas pode ser confirmado, não só pela presença de certas isoformas, mas também pela interação com ligantes específicos (NAOR e NEDVETZKI 2003).

1.2.2.6 CD44/H-CAM

O antígeno CD44/H-CAM é uma glicoproteína transmembrana de 80 a 95 kD que apresenta extensa glicosilação. O antígeno é um receptor de superfície celular para o hialuronato, sugerindo um papel na regulação das interações com substratos celulares e na migração celular (BOSCH 2002). O antígeno CD44 está expresso nas células T, Células B, monócitos, eritrócitos e fracamente nas plaquetas. Também está expresso nas células epiteliais, gliais, fibroblásticas e musculares.

1.2.2.7 CD44v6

A molécula de CD44 pertence a uma família de moléculas de adesão celular encontrada amplamente em células normais e também em células tumorais malignas em tecidos epiteliais, mesoteliais e hematopoéticos. O gen único do CD44 possui 20 éxons, dos quais 10 são normalmente expressos para codificar a molécula de CD44/H-CAM (ALBERS 2002). Os 10 éxons adicionais (v1 a v10) são expressos somente por um splicing alternativo do RNA nuclear. A expressão das moléculas variantes de splice CD44 específicas de adesão celular tem sido associada

com metástases e com um pior prognóstico em certos tumores malignos, como os de mama. Um modelo complexo de expressão de variante CD44 em diferentes tumores comparado com a expressão de CD44 nas células normais de origem destes tecidos tem sido descrito (FOX et al. 1994). Níveis elevados de expressão foram observados em muitos dos éxons variantes em carcinomas mamários, com origem em epitélio ductal, os quais normalmente não expressam CD44. Ao contrário, o epitélio gastrointestinal normal e cânceres de cólon expressaram baixos níveis de muitas variantes testadas (BERTONI 2002).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo estudar, em pacientes portadores de condrossarcoma, os seguintes aspectos:

1. A expressão imunistoquímica da E-caderina, Pan-caderina, CD44v6 e CD44/H-CAM;
2. A correlação entre a expressão das glicoproteínas e variáveis clínicas e anatomopatológicas selecionadas;
3. O valor prognóstico da expressão das glicoproteínas, assim como os fatores prognósticos relacionados à sobrevida livre de doença e sobrevida global.



Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

3 CASUÍSTICA E MÉTODO

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo. Foram revistos os prontuários de pacientes portadores de condrossarcoma registrados no Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer da Fundação Antônio Prudente de São Paulo, atendidos no período de maio de 1953 a dezembro de 2000. Um total de 159 pacientes foi identificado e 90 foram elegíveis para o estudo.

3.1 MÉTODO

3.1.1 Critérios de Elegibilidade

Todos os pacientes incluídos no estudo obedeceram aos seguintes critérios:

1. Confirmação anatomopatológica do condrossarcoma: nos casos onde havia material em blocos de parafina em boas condições de conservação, uma lâmina foi confeccionada com o objetivo de revisão do diagnóstico; nos casos em que o material foi classificado como inadequado, o diagnóstico foi confirmado pela revisão da lâmina que deu origem ao laudo de anatomia patológica constante do prontuário;
2. Para o estudo dos marcadores de adesão celular CD44v6, CD44(HCAM), E-caderina e Pan-caderina, foram selecionados os casos onde havia disponibilidade de material conservado em blocos

de parafina, e considerado adequado para as reações de imunistoquímica, incluindo-se tumores primários e recidivados;

3. Foram excluídos os pacientes cujo material disponível para avaliação anatomopatológica fora adquirido após a realização de quimioterapia e/ou radioterapia. Para os pacientes previamente tratados, utilizou-se o material obtido através da biópsia pré-tratamento, com o objetivo de evitar a possibilidade de modificações moleculares induzidas pela terapêutica.

3.1.2 Variáveis Estudadas

As variáveis avaliadas foram:

- Variáveis demográficas e clínicas: idade, sexo, situação à admissão no Hospital A. C. Camargo, localização, estágio M, tipo de ressecção em relação à margem cirúrgica, tipo de cirurgia;
- Variáveis anatomopatológicas: grau histológico e margem anatomopatológica microscópica;
- Variáveis moleculares: expressão imunistoquímica de CD44/HCAM, CD44v6, E-caderina e Pan-caderina

3.1.3 Critérios de Avaliação das Variáveis

- **Variáveis demográficas e clínicas**

Idade: os pacientes foram divididos em 3 grupos etários: 15 a 30 anos; 31 a 49 anos; ≥50 anos.

Gênero: masculino ou feminino

Ano de admissão: foram estudados os pacientes admitidos entre maio de 1953 a dezembro de 2000 no Hospital A. C. Camargo da Fundação Antônio Prudente. Levando-se em consideração o ano de admissão, foram considerados 2 períodos, a saber: de 1958 a 1979, e de 1980 a 2000.

Primeiro sintoma: para o primeiro sintoma pesquisado foram considerados: presença de massa palpável ou aumento de volume local e dor. Registrou-se a presença ou a ausência de trauma local referido, assim como o tamanho do tumor (medida do maior diâmetro em centímetros) e sua posição intra cortical e extra cortical. Estas variáveis foram registradas com finalidade de avaliação da amostra mas foram analisadas do ponto de vista de seu valor prognóstico.

Tratamento prévio: foram considerados dois grupos, a saber: a) intactos (pacientes sem tratamento prévio ou submetidos apenas à biópsia); b) não intactos (pacientes previamente submetidos a qualquer tipo de tratamento cirúrgico, quimioterapia ou radioterapia). Para os pacientes operados em outro serviço foi considerada ainda a possibilidade de tratar-se de tumor local residual ou recidivado.

Localização do tumor: foram considerados os seguintes sítios primários anatômicos: bacia, fêmur, úmero, tíbia, escápula, rádio, ulna e coluna. Com finalidade de análise do valor prognóstico, em função do número de casos, foram criadas três categorias: bacia, fêmur e outros.

- **Variáveis anatomopatológicas**

Grau histológico: foi utilizada a classificação em 3 categorias: 1) grau I (bem diferenciado) - mantém-se a estrutura semelhante à cartilagem hialina, com maior celularidade, distribuição irregular das lacunas em meio à matriz que é também irregular, com variável número de células por lacuna, às vezes binucleadas, com núcleos hipercoreados e polimorfos; 2) Grau II (moderadamente diferenciado) - ocorre a acentuação das alterações do grau I, com maior polimorfismo, alteração nuclear e distribuição mais desordenada das células nas lacunas; 3) Grau III (indiferenciado) - encontra-se acentuada anaplasia, caracterizada por desordem celular, polimorfismo, hipercromasia dos núcleos, numerosas mitoses atípicas, escassa matriz hialina e áreas mixóides. Encontram-se células fusiformes indiferenciadas.

Margens microscópicas: as margens de ressecção foram avaliadas do ponto de vista histopatológico e classificadas em livres ou comprometidas.

- **Variáveis moleculares**

Padrão de marcação: Foram feitas as marcações com os anticorpos CD44v6, CD44/HCAM, E-caderina e Pan-caderina, considerando-se positivas as reações com $\geq 10\%$ de células tumorais marcadas e negativas as reações com $< 10\%$.

3.1.4 Preparo das Lâminas

Construção do array de tecido (TMA, do inglês tissue microarray)

O material foi revisado por dois patologistas, o Prof. Dr. Fernando Augusto Soares e a Dra. Isabela Werneck da Cunha. A revisão

anatomopatológica foi feita, sempre que possível, a partir de blocos de parafina contendo fragmentos do tumor provenientes da biópsia original ou da peça operatória. Os cortes histológicos foram obtidos e corados por hematoxilina e eosina para a seleção da área representativa. A partir desta seleção foi construído um bloco pela técnica de TMA.

O TMA foi construído utilizando-se o dispositivo técnico chamado de “tissue microarray” (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 transferidos para o bloco de parafina receptor. Um mapa com identificação detalhada de cada cilindro foi construído em planilha de Excel®, permitindo a localização precisa de cada caso. Um caso foi definido como adequado quando o corte resultante ocupou 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 dos números de casos avaliáveis foi realizado pela coloração de 1 lâmina a cada 25 cortes e pela contagem de quantos cilindros estão presentes. O TMA foi considerado esgotado quando mais do que 25% das amostras não estavam presentes nos cortes.

3.1.5 Imunoistoquímica

Os cortes obtidos do bloco de TMA foram submetidos à técnica imunoistoquímica seguindo o seguinte protocolo.

A desparafinização dos cortes foi realizada através de dois banhos sucessivos em xilol, o primeiro a 60°C por 20 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos.

A reidratação foi feita com quatro banhos sucessivos em etanol a 100%, 95%, e a 70%, respectivamente, durante 30 segundos cada um. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada.

A próxima etapa foi a recuperação antigênica em panela de pressão (Eterna® Nigro). A solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 foi fervida na panela aberta e só então as lâminas foram mergulhadas e a panela lacrada com a válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, a válvula de segurança foi abaixada e aguardado a pressurização total. As lâminas permaneceram neste local por cinco minutos após a pressurização. A panela, ainda fechada, foi lavada por dez minutos em água corrente e depois de destampada, foi deixada por dez minutos à temperatura ambiente. A seguir as lâminas foram lavadas novamente em água corrente e destilada.

A peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ 3%, (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada. Nova lavagem em água corrente e destilada, e na seqüência, procedeu-se um banho com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por cinco minutos.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em título preestabelecido conforme a Tabela 2, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, USA) e azida sódica (NaN₃) 0.1%, por 2 horas em temperatura ambiente.

As lâminas foram novamente lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e então incubadas com o anticorpo secundário biotinilado-reagente C (Biotinylated goat antimouse/rabbit Ig) do kit treptABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako A/S, K492,Denmark) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C. Após procedido nova lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada (Tabela 1).

As lâminas foram então incubadas com o complexo-reagente A (Streptavidin) no título pré-estabelecido de 1:200 e reagente B (Biotinylated peroxydase) no título pré-estabelecido de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C para amplificação da reação. Nova lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

A reação foi revelada através da incubação das lâminas em solução substância cromógena de tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) 60 mg% (Sigma, D-5637, USA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Nova lavagem em água corrente e água destilada por 3 minutos.

Os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Após nova lavagem em água corrente e destilada, as lâminas foram

imersas em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0.5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.

Tabela 1 - Descrição do anticorpo primário, clones, título de diluição e fabricantes.

ANTICORPOS	CLONES	TÍTULOS	FABRICANTES/PAÍS/CÓDIGO
CD44(H-CAM)	F10-44-2	1:100	Novocasta Labs Lt/ UK / NCL-CD44
CD44v6	VFF-7	1:100	Novocasta Labs Lt/ UK /NCL-CD44v6
Pan-caderina		1:3000	Sigma / USA / C3678
E-caderina	36	1:750	BD Transduction/ USA / 610182

3.2 CASUÍSTICA

3.2.1 Dados Demográficos, clínicos e anatomopatológicos

As variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas encontram-se referidas na Tabela 2.

A idade mínima foi de 15 anos e a máxima de 73 anos, com média de 40 anos e mediana de 37 anos (desvio padrão = 14,91 anos). Com relação ao gênero, 50 (55,6%) pacientes eram masculinos e 40 (44,4) femininos.

O primeiro sintoma mais freqüentemente referido foi a presença de dor, relatada por 48 pacientes (53,3%). Histórico de trauma local foi relatado por 27 pacientes (30,0%).

Em relação aos aspectos de tratamento prévio à admissão, 58 pacientes (64,4%) foram considerados intactos e 32 (35,6%) foram previamente submetidos a alguma modalidade terapêutica.

Quanto à localização, os sítio anatômicos primários de maior frequência foram a bacia (30 pacientes; 33,3%) e o fêmur (25 pacientes; 27,8%), seguidos pelos demais.

A cirurgia mais realizada foi a ressecção ampla com margem oncológica, em 57 pacientes (63,3%). Amputações foram necessárias em 23 pacientes (25,6%), e a curetagem em 3 (3,3%). Outros sete pacientes receberam outras formas de tratamento. (Tabela 3)

Em relação às taxas de morbi-mortalidade, 69 (85,2%) não apresentaram complicações e um paciente (1,2%) cursou com óbito trans-operatório.

Cinquenta e seis pacientes foram classificados como portadores de condrossarcoma grau I (62,2%), 15 grau II (16,7%) e 19 grau III (21,1%).

As margens de ressecção foram consideradas livres do ponto de vista microscópico em 62 pacientes (68,9%) e comprometidas em 26 (28,9%).

Tabela 2 - Distribuição de variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas em 90 pacientes portadores de condrossarcoma.

Variável	Categoria	n (%)
Ano de admissão	1958 – 1979	21 (23,4)
	1980 – 2000	69 (76,6)
Sexo	Masculino	50 (55,6)
	Feminino	40 (44,4)
Idade (anos)	15 a 30 anos	28 (31,1)
	31 a 49 anos	35 (38,9)
	≥ 50	27 (30,0)
Primeiro sintoma	Massa tumoral ou aumento de volume	34 (37,8)
	Dor	48 (53,3)
	Outro	08 (08,8)
Trauma	Sim	27 (30,0)
	Não	63 (70,0)
Tratamento prévio	Intactos ou biópsia prévia	58 (64,4)
	Não intactos	32 (35,6)
Localização	Bacia	30 (33,3)
	Fêmur	25 (27,8)
	Úmero	08 (08,9)
	Tíbia	05 (05,6)
	Coluna	04 (04,4)
	Outros	18 (20,0)
Grau histológico	GI (bem diferenciado)	56 (62,2)
	GII (moderadamente diferenciado)	15 (16,7)
	GIII (indiferenciado)	19 (21,1)
Margens microscópicas*	Livres	62 (68,9)
	Comprometidas	26 (28,9)

* Avaliado em 88 casos.

Tabela 3 - Distribuição dos 90 pacientes portadores de condrossarcoma segundo o tipo cirurgia realizada.

Tratamento	n (%)
Ressecção ampla	57 (63,3)
Amputação	23 (25,6)
Curetagem	03 (03,3)
Outros	07 (07,7)

3.2.2 Dados do Seguimento

Dentre os 90 pacientes, 73 (81,1%) não desenvolveram metástases, 14 (15,6%) apresentaram metástases pulmonares, 2 (2,2%) cursaram com metástases ósseas e 1 com metástase peritoneal. Recidivas locais foram observadas em 15 pacientes (16,7%). (Tabela 4)

Ao final da análise, 43 pacientes (47,8%) encontravam-se vivos sem doença, 8 (8,9%) estavam vivos com doença e 29 (32,2%) evoluíram com óbito por câncer. Não foi possível atualizar a informação de seguimento para 10 pacientes (11,1%), que foram considerados perdidos de vista. (Tabela 5)

Tabela 4 - Taxas de recidiva local e metástases para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma.

	n (%)
Recidiva local	15 (16,7)
Metástases	17 (18,9)
Local das metástases	
Pulmão	14 (15,6)
Osso	02 (02,2)
Peritônio	01 (01,1)

Tabela 5 - Situação clínica dos 90 pacientes portadores de condrossarcoma ao final da análise.

Situação clínica	n (%)
Vivos sem doença	43 (47,8)
Vivos com doença	08 (08,9)
Óbito por câncer	29 (32,2)
Sem informação disponível	10 (11,1)

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita a análise descritiva da amostra, através de médias, medianas e porcentagens.

Para o cálculo do tempo de sobrevida livre de doença foram consideradas a data da cirurgia e a data de constatação de qualquer evento relacionado a atividade tumoral, incluindo recidiva local e/ou à distância. Para o cálculo do tempo de sobrevida global, considerou-se o período compreendido entre a data da cirurgia e a eventual ocorrência de o óbito, com ou sem sinais de atividade de doença.

As probabilidades de sobrevida acumuladas foram calculadas pelo método de Kaplan e Meier (KAPLAN e MEIER 1958). Para a comparação das curvas de sobrevida, utilizou-se o teste de log-rank (PETO et al. 1977).

Para avaliar a influência das expressões dos marcadores CD44v6, CD44/HCAM, E-caderina e Pan-caderina na sobrevida livre de doença e na sobrevida global, primeiramente foi feita a análise pelo método de Kaplan e Meier. Caso a expressão de algum marcador fosse significativa ($p < 0,05$) na análise pelo método de Kaplan e Meier, foi elaborado modelos de riscos proporcionais de Cox (COX 1972) univariado e múltiplo, para avaliar se o resultado encontrado na análise univariada permanecia independente de sexo, idade, grau histológico e margem. A associação entre a expressão de um marcador e o grau histológico foi feito pelo teste de associação pelo qui-quadrado. Em todas as análises utilizou-se o nível de significância de 5%.

Utilizou-se o programa SPSS 10.0 para Windows (Statistical Solutions limited, Cork, Ireland) para a montagem do banco de dados e para a análise estatística.

3.4 PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

Este estudo é baseado em uma análise retrospectiva de pacientes portadores de condrossarcoma matriculados no Hospital A. C. Camargo da Fundação Antônio Prudente de São Paulo no período de maio de 1953 a dezembro de 2000. Foi respeitado o sigilo da fonte de informação, identificando-se a ficha de cada paciente inicialmente pelo número do prontuário e seu correspondente número de ordem, não sendo possível a identificação dos pacientes, conforme os princípios da Declaração de Helsinki. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO DAS VARIÁVEIS MOLECULARES

As reações imunoistoquímicas para o CD44/HCAM e para a E-caderina foram negativas em 100% dos casos. Para o CD44v6, a leitura não pode ser realizada em 6 amostras. Observou-se expressão em amostras de condrossarcomas de 44 pacientes (44/84; 52,4%) e ausência de expressão em 40 (40/84; 47,6%). Para a Pan-caderina, a leitura foi realizada em 88 amostras. Observou-se expressão imunoistoquímica em 71 amostras (71/88; 80,7%) e ausência de expressão em 17 (17/88; 19,3). (Tabela 6)

Tabela 6 - Resultado da expressão imunoistoquímica de CD44v6 e Pan-caderina em amostras de condrossarcoma.

Variável	Categoria	n (%)
CD44v6*	< 10% (negativo)	40 (47,6)
	≥ 10% (positivo)	44 (52,4)
Pan-caderina**	< 10% (negativo)	17 (19,3)
	≥ 10% (positivo)	71 (80,7)

* Avaliado em 84 amostras; ** avaliado em 88 amostras.

Exemplos das reações imunoistoquímicas para CD44/HCAM, CD44v6, E-caderina e Pan-caderina encontram-se respectivamente nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

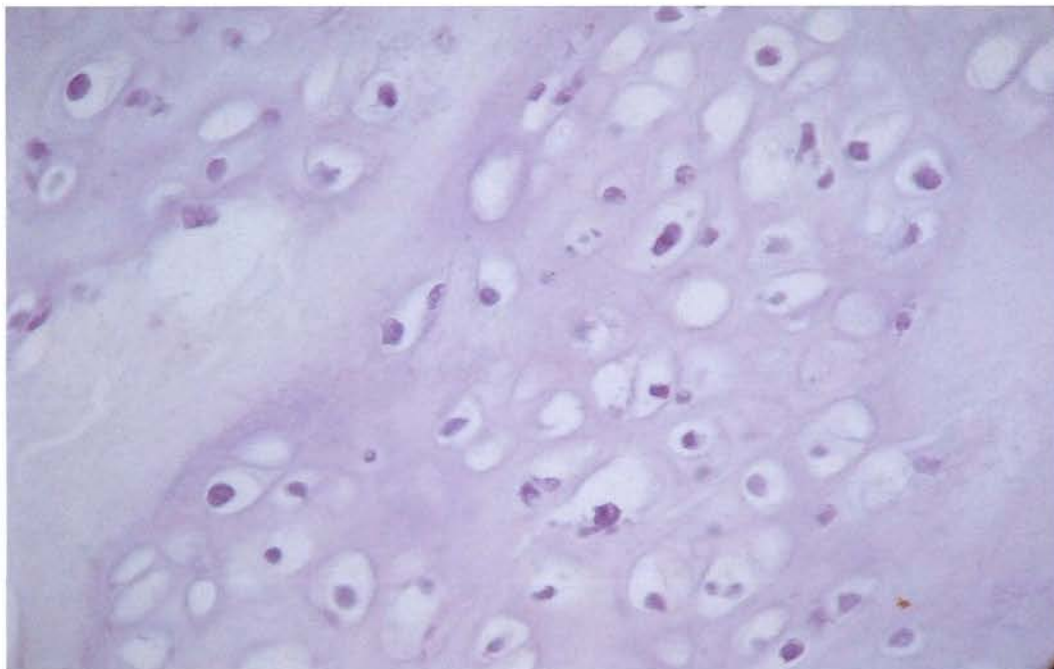


Figura 3 - Fotomicrografia mostrando o resultado negativo para a reação imunoistoquímica do marcador CD44/HCAM. (400x)

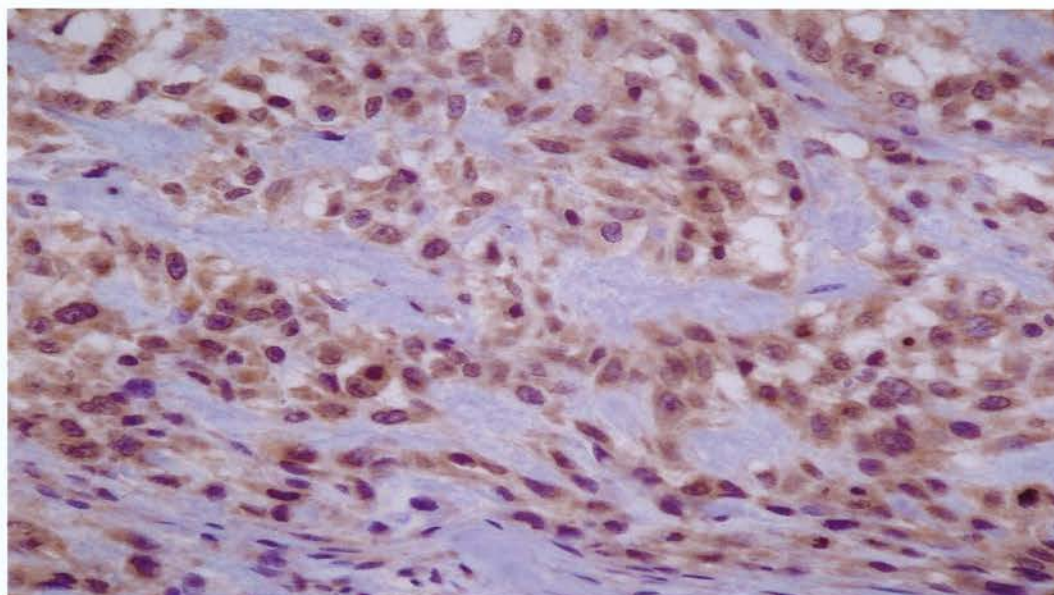


Figura 4 - Fotomicrografia mostrando o resultado positivo para a reação imunoistoquímica do marcador CD44v6. (400x).

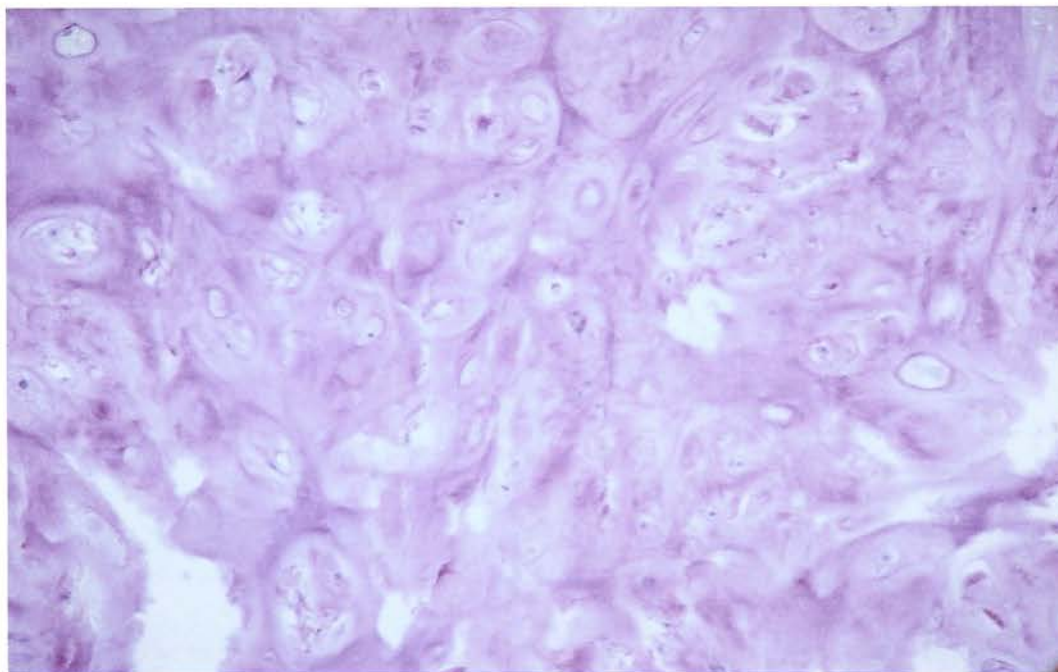


Figura 5 - Fotomicrografia mostrando o resultado negativo para a reação imunoistoquímica do marcador E-caderina. (400x).

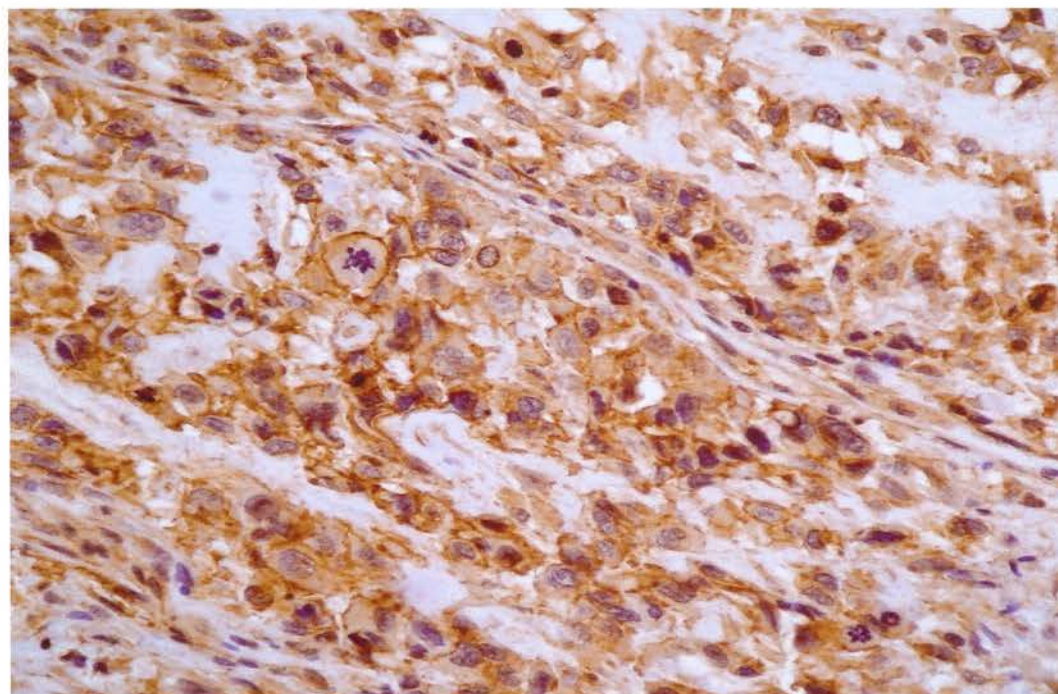


Figura 6 - Fotomicrografia mostrando o resultado positivo para a reação imunoistoquímica do marcador Pan-caderina. (400x)

4.2 FATORES PROGNÓSTICOS RELACIONADOS À SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

A curva de sobrevida livre de doença para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma encontra-se na Figura 7. As taxas de SLD foram de 65,7% e 55,9% respectivamente em 5 e 10 anos. Os fatores que influenciaram o risco de recidiva na análise univariada foram: idade ($p=0,0213$); margem microscópica ($p=0,0001$) e o grau histológico. Os pacientes com idade entre 31 e 49 anos tiveram pior prognóstico; o comprometimento microscópico das margens foi considerado fator adverso; os portadores de condrossarcomas GII e GIII apresentaram maiores índices de recidiva. Os demais fatores estudados não atingiram níveis de significância para valores de $p<0,05$ (ano de admissão, sexo, condição à admissão e localização do tumor).

A presença ou ausência de expressão imunoistoquímica para Pan-caderina e CD44v6 não influenciaram a SLD.

As taxas de sobrevida livre de doença em 5 e 10 anos para cada categoria das variáveis clínicas, anatomopatológicas e moleculares analisadas, assim como os valores de "p" encontram-se referidos na Tabela 7. As curvas de sobrevida para as variáveis com significância estatística (idade, margem microscópica e grau de malignidade histológica) podem ser observadas nas Figuras 8, 9 e 10, e as curvas de SLD para as variáveis Pan-caderina e CD44v6 nos Figuras 11 e 12.

Quando submetidas à análise multivariada pelo modelo de regressão de riscos proporcionais de COX, incluindo-se as variáveis que foram

significantes na análise univariada em modelo ajustado por idade (15-37; >37 anos), foram consideradas variáveis independentes relacionadas ao risco de recidiva os graus histológicos alto e moderado e o comprometimento microscópico das margens. (Tabela 8)

Tabela 7 - Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em 5 e 10 anos para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma.

Variável	Categoria	N(%)	SLD em 5 anos %	SLD em 10 anos %	p ¹
Ano de admissão	1958 – 1979	21 (23,4)	73,2	62,2	0,0885
	1980 - 2000	69 (76,6)	61,6	51,1	
Sexo	Masculino	50 (55,5)	60,9	47,9	0,3791
	Feminino	40 (44,4)	71,1	60,1	
Idade (anos)	15 a 30 anos	28 (31,1)	76,7	76,7	0,0213
	31 a 49 anos	35 (38,8)	53,0	34,4	
	≥ 50 anos	27 (30,0)	71,7	42,8	
Tratamento prévio	Intacto ou biopsia	58 (64,4)	68,9	58,8	0,7361
	Não intacto	32 (35,6)	61,8	52,1	
Localização	Bacia	30 (33,3)	48,7	38,7	0,0674
	Fêmur	25 (27,7)	78,2	62,5	
	Outros	35 (38,8)	73,7	59,6	
Grau histológico	GI	56 (62,2)	77,6	69,5	0,0034
	GII	15 (16,6)	33,0		
	GIII	19 (21,1)	54,3	32,6	
Margens microscópicas ²	Livres	62 (70,4)	76,2	64,5	0,0001
	Comprometidas	26 (29,5)	38,9	23,3	
CD44v6 ³	<10% (negativo)	40 (47,6)	62,8	50,4	0,5263
	≥10% (positivo)	44 (52,4)	69,8	54,9	
Pan-caderina ⁴	<10% (negativo)	17 (19,3)	55,9	55,9	0,5740
	≥10% (positivo)	71 (80,7)	67,1	54,4	

¹ Valores de p pelo teste de Log Rank

² Avaliado em 88 amostras

³ Avaliado em 84 amostras

⁴ Avaliado em 88 amostras

Tabela 8 - Risco de recidiva em pacientes portadores de condrossarcoma – Modelo multivariado por variáveis selecionadas.

Variável	Categoria	Risco relativo	Intervalo de confiança (95%)	p
Grau	Baixo	1,00	(ref.)	
	Alto	2,28	1,1 – 5,4	0,059
	Moderado	2,55	1,1 – 6,2	0,037
Margens	Livres	1,00	(ref.)	
	Comprometidas	3,08	1,5 – 6,4	0,002
Faixa etária * (anos)	15 – 37	1,00	(ref.)	0,022
	>37	2,35	1,1 – 4,9	

*Modelo multivariado, ajustado por idade e utilizando 2 categorias de faixa etária devido ao pequeno número de eventos (32 recidivas).

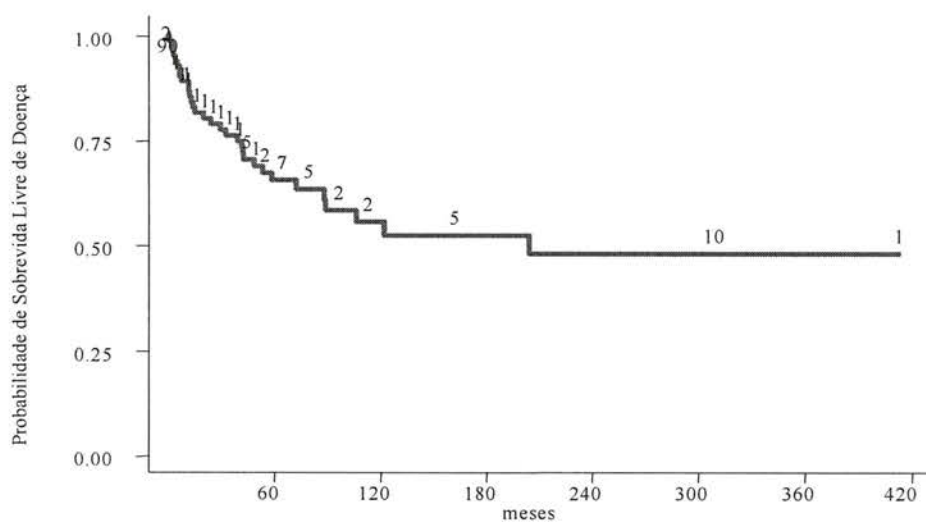


Figura 7 - Curva de sobrevida livre de doença em meses para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma.

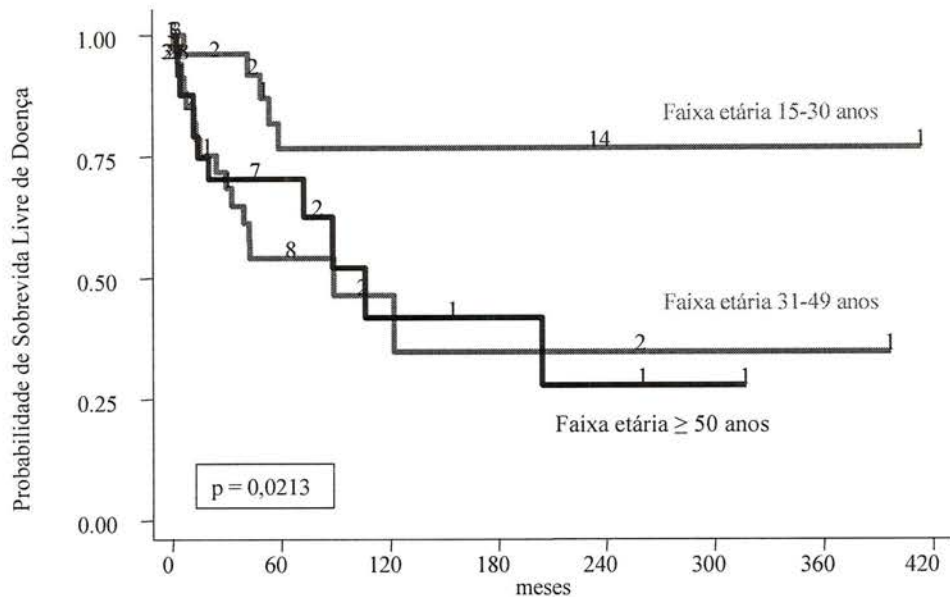


Figura 8 - Curva de sobrevida livre de doença em meses para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma segundo o grupo etário.

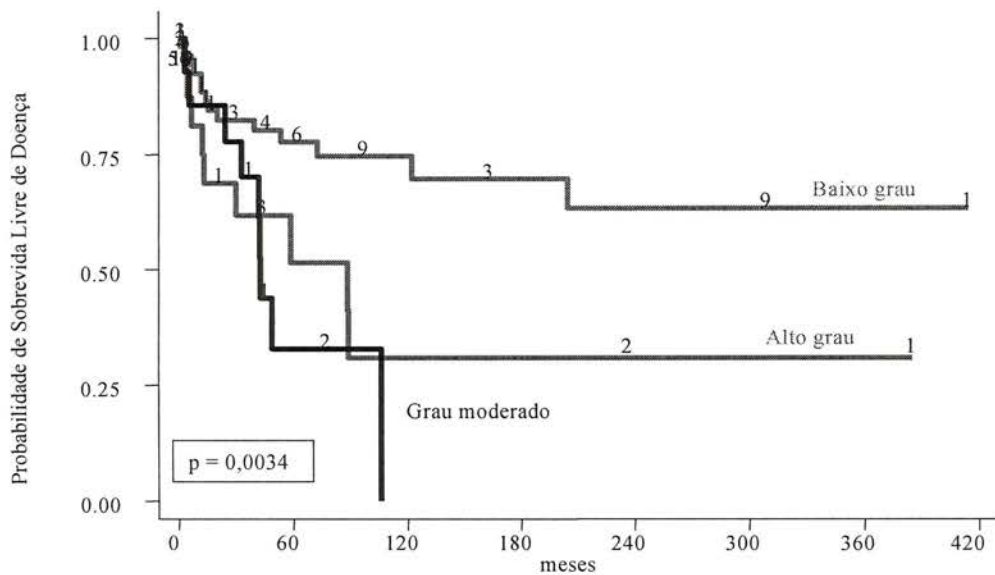


Figura 9 - Curva de sobrevida livre de doença em meses para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma segundo o grau de malignidade histológica.

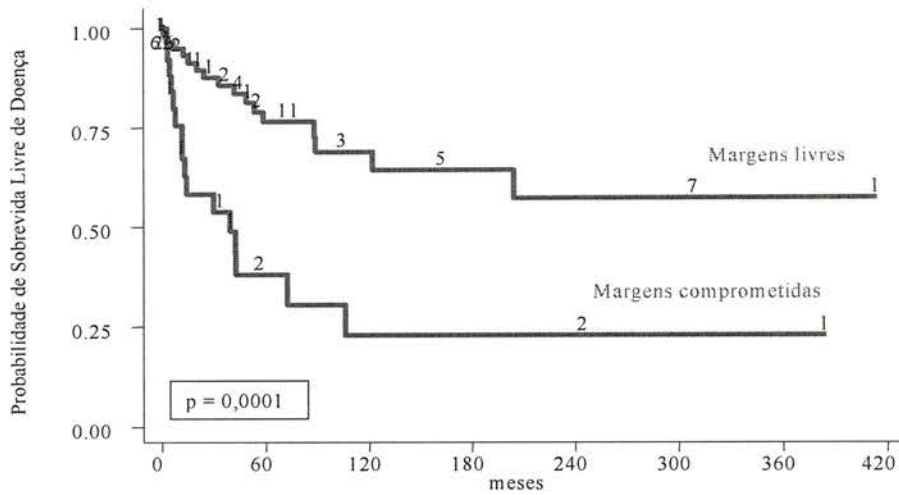


Figura 10 - Curva de sobrevida livre de doença em meses para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma segundo a avaliação microscópica das margens de ressecção.

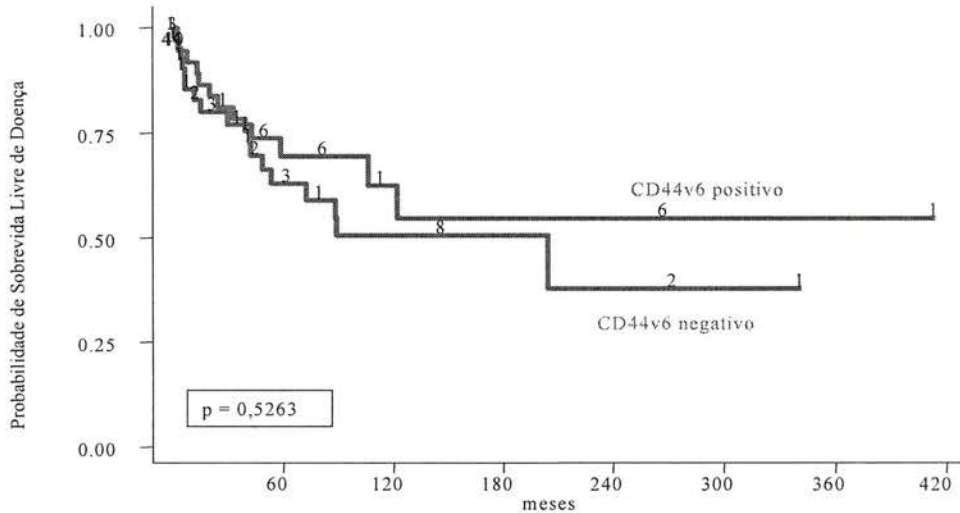


Figura 11 - Curva de sobrevida livre de doença em meses para 84 pacientes portadores de condrossarcoma segundo a expressão imunoistoquímica de CD44v6.

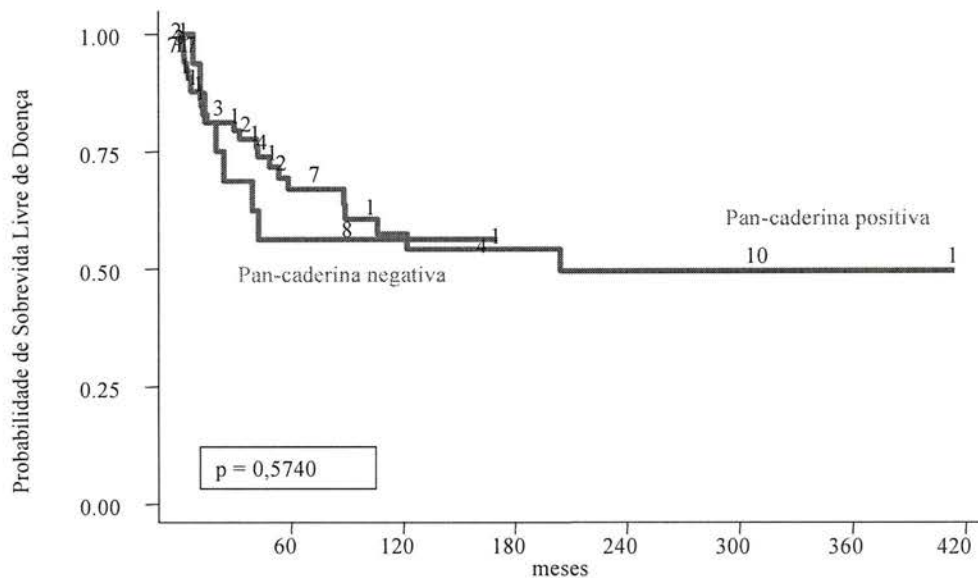


Figura 12 - Curva de sobrevida livre de doença em meses para 88 pacientes portadores de condrossarcoma segundo a expressão imunoistoquímica de Pan-caderina.

4.3 FATORES PROGNÓSTICOS RELACIONADOS À SOBREVIDA GLOBAL

A curva de sobrevida global para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma está apresentada na Figura 13. As taxas de SG foram de 72,2% e 63,2% respectivamente em 5 e 10 anos. O único fator que influenciou o risco de óbito na análise univariada foi o ano de admissão, com maior risco de óbito para os pacientes tratados no período mais antigo, entre 1958 e 1979 ($p=0,0232$). As demais variáveis estudadas não influenciaram o

risco de óbito, pois não atingiram níveis de significância para valores de $p < 0,05$.

A presença ou ausência de expressão imunoistoquímica para Pan-caderina e CD44v6 também não influenciou a SG.

Não realizamos à análise multivariada pelo modelo de regressão logística de riscos proporcionais de COX para avaliação do risco de óbito porque as variáveis estudadas não apresentaram nível de significância na análise univariada, à exceção da variável ano de admissão.

As taxas de sobrevida global em 5 e 10 anos para cada categoria das variáveis clínicas, anatomopatológicas e moleculares analisadas, assim como os valores de "p" encontram-se referidos na Tabela 9.

As curvas de sobrevida para para as variáveis Pan-caderina e CD44v6 encontram-se nos Figuras 14 e 15.



Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kunin:
Coordenadora Pós-Graduação

Tabela 9 - Taxas de sobrevida global (SG) em 5 e 10 anos para os 90 pacientes portadores de condrossarcoma.

Variável	Categoria	N(%)	SG em 5 anos %	SG em 10 anos %	p ¹
Ano de admissão	1958 – 1979	21 (23,4)	57,1	42,9	0,0232
	1980 - 2000	69 (76,6)	76,9	71,9	
Sexo	Masculino	50 (55,5)	61,4	58,2	0,4370
	Feminino	40 (44,4)	73,5	68,7	
Idade (anos)	15 a 30 anos	28 (31,1)	79,8	74,6	0,2522
	31 a 49 anos	35 (38,8)	62,1	56,7	
	≥ 50 anos	27 (30,0)	65,8	59,2	
Tratamento prévio	Intacto ou biopsia	58 (64,4)	67,2	60,9	0,3018
	Não intacto	32 (35,6)	80,4	67,5	
Localização	Bacia	30 (33,3)	67,9	67,9	0,8407
	Fêmur	25 (27,7)	66,9	59,4	
	Outros	35 (38,8)	66,7	61,7	
Grau histológico	GI	56 (62,2)	73,6	70,8	0,3203
	GII	15 (16,6)	55,8	55,8	
	GIII	19 (21,1)	52,2	43,5	
Margens microscópicas ²	Livres	62 (70,4)	71,4	68,6	0,1904
	Comprometidas	26 (29,5)	55,0	48,5	
CD44v6 ³	<10% (negativo)	40 (47,6)	74,0	74,0	0,1860
	≥10% (positivo)	44 (52,4)	62,5	58,0	
Pan-caderina ⁴	<10% (negativo)	17 (19,3)	85,9	75,8	0,1076
	≥10% (positivo)	71 (80,7)	61,6	59,9	

¹ Valores de p pelo teste de Log Rank

² Avaliado em 88 amostras

³ Avaliado em 84 amostras

⁴ Avaliado em 88 amostras

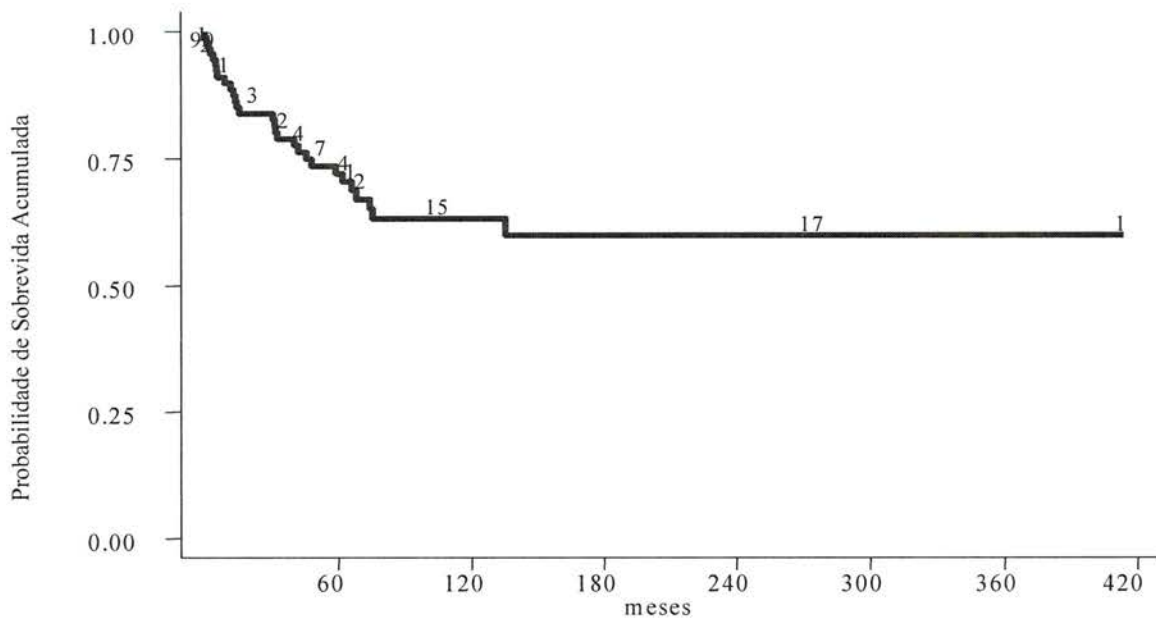


Figura 13 - Curva de sobrevida global em meses para 90 pacientes portadores de condrossarcoma.

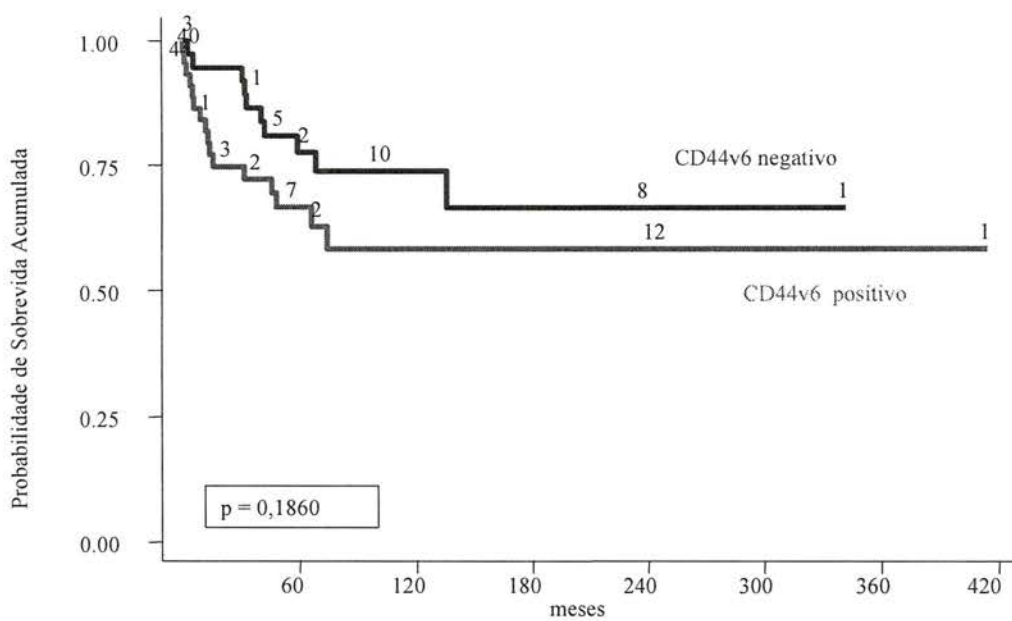


Figura 14 - Curva de sobrevida global em meses para 84 pacientes portadores de condrossarcoma segundo a expressão imunoistoquímica de CD44v6.

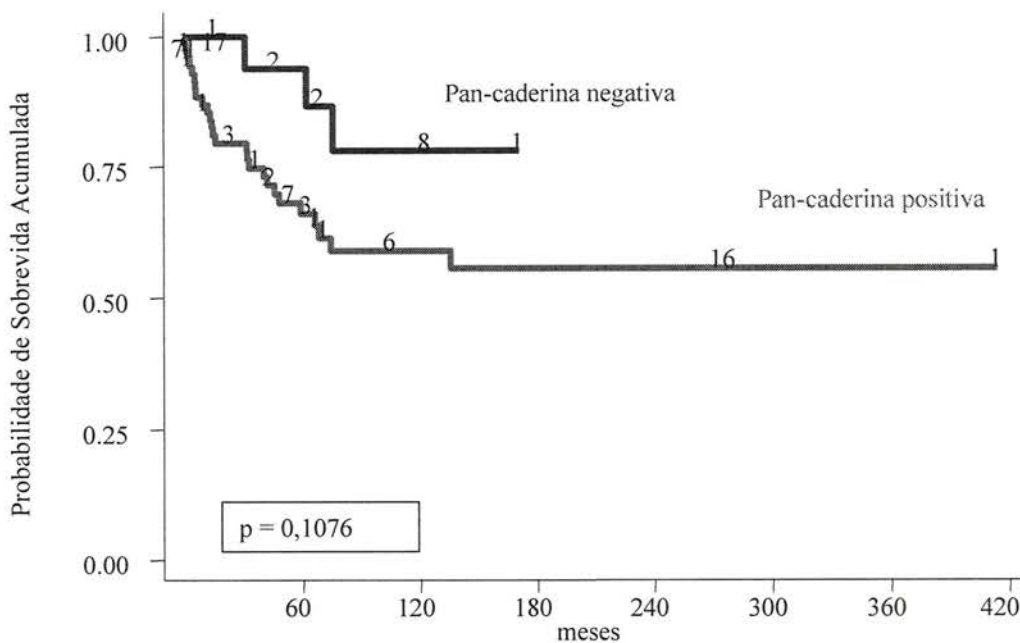


Figura 15 - Curva de sobrevivência global em meses para 88 pacientes portadores de condrossarcoma segundo a expressão imunohistoquímica de Pan-caderina.

4.4 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE CD44v6 e PAN-CADERINA COM O GRAU HISTOLÓGICO

Houve associação estatisticamente significativa entre a expressão de CD44v6 e o grau histológico ($p=0,020$), verificando-se maior porcentagem de positividade quanto maior o grau. Em relação à expressão de Pan-caderina, não se observou correlação significativa ($p=0,145$). (Tabela 10)

Tabela 10 - Estudo da correlação entre a expressão imunoistoquímica de CD44v6 e Pan-caderina e o grau histológico em amostras de condrossarcoma.

Marcador		Grau Histológico			p
		1 Nº e %	2 Nº e %	3 Nº e %	
CD44v6 ¹	Negativo	09 (60,0)	28 (53,8)	03 (17,6)	0,020
	Positivo	06 (40,0)	24 (46,2)	14 (82,4)	
Pan-caderina ²	Negativo	06 (35,3)	09 (17,3)	02 (10,5)	0,145
	Positivo	11 (64,7)	43 (82,7)	17 (89,5)	

¹ Avaliado em 84 amostras

² Avaliado em 88 amostras

5 DISCUSSÃO

Os tumores primários do sistema músculo esquelético são raros e correspondem a 0,2% de todos os cânceres (JEMAL et al. 2004). Nos Estados Unidos, para o ano de 2005, a estimativa é de 2.570 novos casos e 1.210 óbitos (JEMAL et al. 2005). Considerando-se a inexistência de fatores de risco ambientais claramente relacionados à gênese dos tumores músculo esqueléticos, é possível fazer uma estimativa para o ano de 2005 no Brasil com base na diferença de cifras populacionais. Assim, considerando-se que a população dos Estados Unidos é hoje 1,6 vezes maior do que a população brasileira, esperaríamos no Brasil, em 2005, cerca de 1600 casos novos e 750 óbitos por tumores primários do sistema músculo esquelético.

O condrossarcoma corresponde de 13,3% a 15,8% dos tumores ósseos primários (KRICUN 1993; BERTONI et al. 2002). Em nossa casuística, que compreende um período de 42 anos (1958 a 2000) de pacientes tratados em um centro de referência no tratamento de câncer no Brasil, observamos o registro de 159 pacientes, o que corresponde a uma taxa inferior a 4 casos novos por ano, dado este que corrobora para explicar a dificuldade em se adquirir novos conhecimentos sobre esta neoplasia. Dentre os 90 pacientes elegíveis para o estudo, 21 pertencem ao período de 22 anos entre 1958 e 1979 (em média menos de 1 paciente por ano), e 69 pertencem ao período de 20 anos entre 1980 e 2000 (em média menos de 4 pacientes por ano).

Algumas características inerentes à dificuldade de diagnóstico e previsão do comportamento biológico dos condrossarcomas, tornam importantes as pesquisas em busca de novos dados que possam contribuir para o melhor entendimento da história natural da doença e, como conseqüência, permitir o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de tratamento, buscando aumento das taxas de sobrevida e melhora da qualidade de vida. Nesse sentido, quando consideramos a dificuldade em se determinar se uma lesão cartilaginosa é benigna (encondroma) ou maligna (condrossarcoma de baixo grau), ou em diferenciar um condrossarcoma de um outro tumor com componente condróide, ou ainda frente à grande variabilidade de apresentação clínica, cria-se uma perspectiva para o encontro, através de estudos que envolvem biologia molecular, de novos fatores de importância prognostica. Some-se a isso o fato de que nos últimos cinquenta anos não se observou aumento significativo nas taxas de sobrevida de pacientes portadores de condrossarcoma. Na tentativa de obter respostas a estes questionamentos realizamos o presente estudo.

No entendimento dos processos envolvidos na carcinogênese, a utilização de marcadores moleculares teve um desenvolvimento muito rápido nas últimas décadas, principalmente devido à melhoria nas técnicas que permitiram a manipulação do material genético (EISEN et al. 1998).

A detecção de células tumorais circulantes e da doença tumoral residual mínima ressurgiu há cerca de vinte anos com o advento da imunistoquímica. Testes imunocitológicos foram desenvolvidos para detectar células tumorais na medula óssea e em tumores sólidos (GION e

GASPARINI 2002). A aplicação da imunohistoquímica tem contribuído efetivamente como um recurso a mais no campo diagnóstico das neoplasias, principalmente nas lesões pouco diferenciadas morfológicamente. Este recurso tem permitido, em algumas situações, a classificação de lesões com base na imunodeteção de seu perfil antigênico.

O valor dos estudos nessa área depende, além da seleção do marcador, da metodologia a ser utilizada. Faz-se necessário atenção no isolamento e na preparação da amostra, quer seja advinda de material fresco ou arquivado. Não parece haver dúvidas de que materiais frescos têm a vantagem de permitir análises prospectivas e um delineamento de experimentos com controle de muitas variáveis; por outro lado, o material arquivado oferece a possibilidade de se trabalhar com amostras maiores. Por ser o condrossarcoma um tumor ósseo primário maligno raro, e pela constatação do extenso período para se chegar ao número de 159 pacientes, torna-se impraticável a realização de estudo prospectivo em curto período de tempo em uma única instituição.

Os *DNA microarrays* podem ser utilizados para identificar genes com expressão diferencial entre dois tipos distintos de tecidos ou numa série de amostras clínicas. Esta técnica se mostra valiosa, por exemplo, na busca por marcadores tumorais ou alvos para drogas (EISEN et al. 1998).

Os estudos empregando a metodologia de DNA microarray com o objetivo de classificar e identificar mecanismos moleculares associados aos tumores malignos do sistema músculo esquelético, e sua eventual correlação com o prognóstico de pacientes portadores dessa neoplasia não são freqüentes. A maioria desses estudos envolvem um número pequeno de pacientes. Não foram localizados estudos dos marcadores CD44/H-CAM, CD44v6, E-caderina e Pan-caderina em condrossarcomas.

No presente estudo o sexo masculino (55,6%) foi o mais acometido, semelhante ao encontrado na maioria das séries, onde os condrossarcomas são mais prevalentes no sexo masculino, na proporção de 1,5:1,0 (SCHAJOWICZ 2000). A idade média foi de 40 anos (desvio padrão = 14,9 anos), sendo que 35 pacientes (38,9%) apresentaram idade entre 31 e 49 anos, concordante com BERTONI et al. (2002). A localização óssea mais freqüente foi a bacia, em 30 pacientes (33,3%), localização esta que também tem sido referido por outros autores como preferencial (DORFMANN e CZERNIAK, 1997).

A cirurgia com margem adequada, obedecendo aos princípios da ressecção oncológica, é principal arma terapêutica para o controle local e a importância deste fato é enfatizada por diversos autores (LICHTENSTEIN e JAFFE 1943; DAHLIN e HENDERSEN 1956; CAMPANACCI et al. 1975; MARCOVE 1977; DORFMANN e CZERNIAK 1997; SCHAJOWICZ 2000; PRÓSPERO 2001; BERTONI et al. 2002). Na presente série, a operação mais realizada para o controle local do condrossarcoma foi a ressecção ampla com margem oncológica, em 57 pacientes (63,3%), concordante com MARCOVE (1977), UNNI (1996) e SCHAJOWICZ (2000). No entanto, amputações foram necessárias em 23 pacientes (25,6%), o que demonstra que parte dos pacientes chegam aos centros de referência com doença localmente avançada ou com manipulações prévias inadequadas, o que indiretamente reflete, além de problemas de ordem sócio-econômica, um certo desconhecimento da patologia por parte da comunidade médica não especialista.

Mais de 90% dos condrossarcomas são classificados como convencional e apresentam evolução clínica lenta. As metástases são relativamente raras e ocorrem mais tardiamente (DAHLIN 1976). Em nossa

série, às metástases pulmonares foram as mais freqüentes e ocorreram em 14 pacientes (15,6%), como também observado por outros autores (BJORNSSON et al. 1998). No estudo de BJORNSSON et al., a taxa de sobrevida global em 5 anos foi de 77%, e a taxa de recidiva local foi de 20%. Em nossa casuística, as margens cirúrgicas estavam livres em 62 pacientes (68,9%) e comprometida em 26 (28,9%). A taxa de recidiva local foi de 16,7% (15 pacientes) e a taxa de sobrevida global em 5 anos de 71,9%, dados estes semelhantes aos encontrados nas publicações referidas.

A melhoria nas técnicas cirúrgicas tem permitido um declínio nas taxas de amputação, porém os extensos tumores da região da bacia seguramente limitam a possibilidade de uma ressecção mais ampla com margens oncológicas seguras. UNNI (1996) relata que o melhor tratamento para o condrossarcoma é a cirurgia precoce, com remoção radical, com margem ampla pelos tecidos não comprometidos pela lesão. Porém, o procedimento cirúrgico depende da localização, extensão e grau histológico. O autor preconiza para os tumores "borderline", ou seja, com insuficiência histológica para condrossarcoma grau I, mas com radiologia indicativa de lesão agressiva, especialmente se houver erosão endosteal, uma abordagem com janela óssea, onde se visualize completamente a lesão e se faça a remoção do tumor por curetagem, seguida de eletrocautério. Refere ainda que esse tipo de abordagem não tem levado a recorrência nas séries da Mayo Clinic (UNNI 1996).

Em nossa série, os fatores adversos relacionados ao risco de recidiva, considerando-se recidiva local e à distância, foram a idade acima de 30

anos, os graus histológicos moderado e alto, e o comprometimento microscópico das margens, fatores estes que permaneceram como variáveis de valor prognóstico independente na análise multivariada. O gênero, masculino ou feminino, também em outras séries não tem sido apontado como fator relacionado ao prognóstico em portadores de condrossarcomas.

PRITCHARD et al. (1980) estudaram 280 pacientes portadores de condrossarcoma e concluíram que o tamanho do tumor e o grau histológico foram os fatores mais significantes para o prognóstico. No presente estudo, com relação ao grau histológico, 54 pacientes (60,0%) eram portadores de condrossarcoma grau I, concordante com os achados de literatura, que mostram uma predominância dos graus I e II (BJORNSSON et al. 1998). Apesar de registrar o tamanho dos tumores para análise da casuística, não analisamos esta variável do ponto de vista prognóstico.

Em nossa série, a localização do tumor não foi considerada uma variável relacionada à sobrevida livre de doença, no entanto, os fatores que influenciaram o risco de recidiva local foram a localização em bacia e o comprometimento microscópico das margens (Tabela 7). Quando se analisa mais detalhadamente as taxas de sobrevida livre de doença em 5 e 10 anos para os portadores de condrossarcoma da bacia, verifica-se que estas são consideravelmente inferiores às taxas observadas para os portadores de condrossarcomas do fêmur e de outras localizações. Provavelmente não houve diferença estatística entre as diferentes localizações em função de termos agrupado os tumores pela frequência de aparecimento, e não pela localização anatômica. Assim, um grupo foi constituído concomitantemente

por condrossarcomas de localizações favoráveis e desfavoráveis, prejudicando uma diferenciação mais específica.

Em relação à sobrevida global, o único fator que influenciou o risco de óbito foi o período de admissão, com pior prognóstico para os pacientes tratados no primeiro período, entre 1958 e 1979. Devemos inferir que, em função dos progressos médicos nos campos da anestesia, medicina intensiva e técnica cirúrgica, as taxas de morbidade e mortalidade, em geral, foram diminuindo ao longo dos anos. Vinte e nove pacientes desta série de 90 faleceram com câncer no período compreendido entre a data da cirurgia e a última atualização dos dados. Houve apenas 1 óbito trans-operatório, e não observamos óbitos no período pós-operatório até 30 dias. Assim, não é possível explicar o maior risco de óbito no primeiro período como consequência de uma maior taxa de mortalidade operatória. Talvez o pior prognóstico desse grupo de pacientes estivesse relacionado ao menor conhecimento dos aspectos terapêuticos do condrossarcoma e portanto a uma maior risco de recidiva local e progressão de doença. Outra possível explicação é que, fazendo-se um paralelo com a história do Hospital do Câncer AC Camargo de São Paulo, o primeiro período de análise reúne pacientes que em função da condição sócio-econômica, muitas vezes chegavam ao serviço com tumores de grandes proporções, a julgar pela taxa de cirurgias de amputação e desarticulação que eram significativamente maiores no início e declinaram em anos mais recentes.

Alguns membros da família das caderinas e cateninas estão envolvidas na condrogênese. Mutações genéticas na catenina foram detectadas em tumores malignos ósseos (MONAGHAN et al. 2001).

Foi realizado um estudo envolvendo a expressão de caderina, β -catenina, e a supressão tumoral do produto do gene APC, em tecido ósseo e cartilaginoso em diferentes estágios de maturação esquelética humana, em condições não-neoplásicas e neoplásicas (MONAGHAN et al. 2001). A amostra do estudo constou de 5 casos de tecido de costela fetal, 7 casos de osso tibial normal, 17 de tecido de joelhos de portadores de artrose, 6 de tumor gigante celular, 3 de osteoma osteóide, 9 de osteossarcoma, 1 de condroblastoma e 5 casos de condrossarcoma. Os autores concluíram que as interações do complexo catenina-caderina são importantes na regulação das atividades celulares e que anormalidades na expressão ou função deste complexo pode ser importante no desenvolvimento e comportamento clínico dos tumores ósseos (MONAGHAN et al. 2001).

O cordoma, um tumor maligno que acomete o esqueleto axial, expressa marcador celular epitelial (citoqueratina e antígeno epitelial de membrana). Foram estudados 7 pacientes portadores de cordoma. Em 5 casos se observou a aparência típica das células do cordoma, mas em 2 casos foram caracterizados áreas de cordoma com diferenciação condróide. A citoqueratina foi fortemente expressa nos cordomas convencionais, mas foi detectada em poucas células dos 2 casos de cordoma condróide. A pesquisa da E-caderina nestes pacientes foi positiva. O autor estudou ainda, a expressão da E-caderina em 6 pacientes portadores de tumores

cartilagenosos (encondroma, condrossarcoma e osteocondroma), que se mostrou negativa. Foi sugerido que a positividade da E-caderina para os cordomas condróides possa ser útil como marcador diferencial entre os tumores cartilagenosos (MORI et al. 2002).

Um estudo da expressão de E-caderina, CD44 e CD44v6 em tumor maligno mesofaríngeo foi realizado com 57 pacientes submetidos a tratamento com intenção curativa e encontrou 82,5% de positividade para a E-caderina, 75,4% para o CD44 e 78,9% para o CD44v6. Houve discreta correlação entre a marcação do CD44v6 e o volume tumoral, metástase linfonodal e classificação do estágio tumoral ($p > 0,05$), porém não houve correlação significativa entre a expressão da E-caderina, CD44 e CD44v6 e características clinicopatológicas e os autores concluíram que o CD44v6 pode estar relacionado com processos de invasão tumoral e metastatização e que Cd44 e CD44v6 podem ser marcadores úteis na avaliação de prognóstico em alguns tumores de cabeça e pescoço (KAWANO et al. 2004).

Em muitos tumores malignos a expressão de CD44 ou de seu variante CD44v6 tem sido associado com o prognóstico. A significância clínica do CD44 em sarcomas de partes moles foi estudada em 133 pacientes e a expressão da variante CD44v6 foi verificada em 57% dos casos. Nestes pacientes, a forte expressão do marcador estava associado com tumores de baixo grau de malignidade ($p = 0,04$), e a expressão alta do marcador, com um risco maior para a recorrência local. A baixa expressão

do marcador se correlacionou com uma sobrevida pobre ($p=0,02$) (MAULA et al. 2001).

Apesar de as neoplasias cartilaginosas de baixo grau de malignidade consistirem tipicamente de cartilagem do tipo hialina, algumas delas também apresentam regiões fibrocartilaginosas. Levando-se em consideração que o CD44, um receptor de superfície celular para o hialuronato, é identificado na cartilagem, foi estudado seu variante v6 no sentido de se encontrar alguma relação com as regiões fibrocartilaginosas tumorais. Foram estudados o material proveniente de 4 cartilagens articulares normais, 1 de condromatose sinovial e 3 de condrossarcomas, classificados como grau I ou I/II. O CD44v6 foi identificado em todas as amostras. Na cartilagem normal foi identificado nas camadas médias e profundas, e nos condrossarcomas foi identificado somente nas regiões da cartilagem tipo hialina, não sendo localizado nas regiões fibrocartilaginosas. Foi sugerido que a falta da expressão de CD44v6 podia estar relacionada com a alteração tecidual fenotípica, em regiões fibrocartilaginosas (BOSCH et al. 2002).

No presente estudo utilizou-se a imunistoquímica na tentativa de uma possível correlação existente, entre a expressão das proteínas de adesão celular CD44/HCAM, CD44v6, E-caderina e Pan-caderina e o prognóstico em 90 pacientes portadores de condrossarcoma. Caso fosse possível a identificação de alterações, para mais ou para menos, nas expressões dos referidos marcadores, poderíamos entender melhor o comportamento específico do condrossarcoma, e utilizar essa informação para separar os pacientes em grupos e conduzir a escolha de uma

terapêutica mais eficaz para os pacientes pertencentes ao grupo reconhecidamente mais agressivo e com pior prognóstico.

Nas condições do nosso estudo, verificamos que os condrossarcomas não expressam as proteínas de adesão celular E-caderina e CD44/H-CAM, mas expressam Pan-caderina e CD44v6 e que existe correlação entre a expressão imunistoquímica de CD44v6 e o grau de malignidade histológica, verificando-se maior porcentagem de positividade quanto maior o grau. As variáveis estudadas, no entanto, não se correlacionaram com o prognóstico.

Ainda que consideremos a identificação de vários marcadores moleculares promissores, sabemos que até o momento muitos permanecem com aplicações experimentais, provavelmente pela variabilidade nos métodos de detecção. Quando buscamos um marcador considerado ideal para aplicação clínica, gostaríamos que este possuísse as características de alta especificidade (para não ser detectado, por exemplo, em tumores benignos), alta sensibilidade (para ser detectado precocemente, ou seja, quando da atividade de pequeno agrupamento de células tumorais; ter um tecido de especificidade; ter boa correlação com os estágios do tumor e finalmente, ter uma boa correlação com o prognóstico (SELL 1991). Apesar de sua conhecida importância nos processos de transformação e progressão neoplásica, as proteínas de adesão celular estudadas não se correlacionaram com o prognóstico em pacientes portadores de condrossarcoma. Não existem publicações semelhantes que permitam uma análise comparativa, o que nos estimula a no futuro, prosseguir em busca de maiores informações a respeito da biologia molecular desse tumor.

6 CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo em pacientes portadores de condrossarcoma podemos concluir que:

1. Os condrossarcomas não expressam as proteínas de adesão celular E-caderina e CD44(H-CAM), mas expressam Pan-caderina e CD44v6;
2. Existe correlação entre a expressão imunoistoquímica de CD44v6 e o grau de malignidade histológica, verificando-se maior porcentagem de positividade quanto maior o grau;
3. São fatores adversos para a sobrevida livre de doença a idade acima de 30 anos, os graus histológicos moderado e alto, e o comprometimento microscópico das margens. As proteínas de adesão celular CD44v6 e Pan-caderina não são variáveis relacionadas ao risco de recidiva e óbito.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackermann LV, Spjut HJ. **Tumors of bone and cartilage**. Washington: Air Force Institute Pathology; 1962. (Atlas of tumor pathology, Fasc.4.)

Albers B, Bray D, Lewis J, et al. **Molecular biology of the cell**. 4rd ed. New York: Garland; 2002. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix: cell-cell adhesion; p.1080-90.

Bast R, Kufe D, Pollock R, et al. **Cancer medicine**. 5rd ed. Canadá: BC Decker; 2000. Invasion and matastasis; p.121-32.

Bertoni F, Bacchini P, Hogendoorn PCW. Chondrosarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editors. **Pathology & genetics tumours of soft tissue and bone**. Lyon; IARC Press; 2002. p.247-58. (World Health Organization Classification of Tumours, 4).

Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. **Biochem Biophys Acta** 1994; 1198:11-26.

Bjornsson J, McLeod RA, Unni KK, Ilstrup DM, Pritchard DJ. Primary chondrosarcoma of long bones and limb girdles. **Cancer** 1998; 83:2105-19.

Bosch P, Stevens JW, Noonan KJ, et al. Expression of CD44 in human neoplastic and normal hyaline cartilage. **Iowa Orthop J** 2002; 22: 47-54.

Caallaro U, Christofori G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. **Biochem Biophys Acta** 2001; 1552:39-45.

Campanacci M, Guernelli N, Leonessa C, Boni A. Chondrosarcoma: a study of 133 case, 80 with long term follow-up. **Italy J Orthop Traumatol** 1975; 1:387-414.

Conacci-Sorrell, M, Simcha I, Ben-Yedidia T. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the rules of β -catenin signaling, Slug, and MAPK. **J Cell Biol** 2003; 163:847-57.

Cooper GM, Hausman RE. **The cell: a molecular approach**. 3rd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2003. Available from: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=cooper+mg+adhesion+AND+cooper%5Bbook%5D+AND+165941%5Buid%5D&rid=cooper.section.2058#2059>> [2005 Jun 21].

Cox DR. Regression models and life-tables (with discussion). **J R Stat Soc B** 1972; 34:187-220.

Dahlin DC, Hendersen ED. Chondrosarcoma, a surgical and pathological problem: review of 212 cases. **J Bone Joint Surg [Am]** 1956; 38:1025-38.

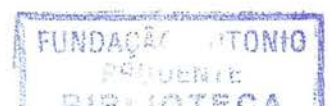
Dahlin DC. Chondrosarcoma and its "variant" In: Ackerman LV, Sjut HJ, Abell MR, editors. **Bone and joints**. Baltimore: Williams & Wilkins; 1976. p.300-11.

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

Durighetto Júnior AF, Amado A, Naufel FS, Candelas M. Condrossarcoma. **Rev Odontol Bras Central** 1994; 4:31-4.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc Natl Acad Sci** 1998; 95:14863-68.

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação



Evans HL, Ayala AG, Romsdahl MM. Prognostic factors in chondrosarcoma of bone: a clinicopathologic analysis with emphasis on histologic grading. **Cancer** 1977; 40:818-31.

Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, et al. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. **Cancer Res** 1994; 54:4539-46.

Gion M, Gasparini G. Biomarkers as therapeutic targets: toward personalized treatments in oncology. In: Diamantis EP, Fritsche HA, Lilja H, Chan DW, Schiwarta MK, editors. **Tumor markers: physiology, pathobiology, technology, and clinical applications**. Washington DC: AACCC Press; 2002. p.151-62.

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

Hirohashi S. Adhesion system in human cancers. **Am J Pathol** 1998; 153:333-9.

Huvos AG. **Bone tumors: diagnosis, treatment and prognosis**. Philadelphia: W. B. Saunders; 1991. Chondrosarcoma; p.302-12.

Jaffe HL. **Tumors and tumours conditions of the bones and joint**. Philadelphia: Lea & Febiger; 1958. Chondrosarcoma; p.316-43.

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. **CA Cancer J Clin** 2004; 54:8-29.

Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2005. **CA Cancer J Clin** 2005; 55:10-30.

Kajima T, Kawaguchi J, Takeshita S, et al. Anomalous cadherin expression in osteosarcoma: possible relationship to metastasis and morphogenesis. **Am J Pathol** 1999; 155:1549-55.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc** 1958; 53:457-81.

Kawano T, Nakamura Y, Yanoma S, et al. Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer. **Auris Nasus Larynx** 2004; 31:35-41.

Kreicbergs A, 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.

Kricun ME. **Imaging of bone tumors**. Philadelphia: W. B. Saunders; 1993. Tumors of long bones: chondrosarcoma; p.60-2.

Lichtenstein L, Jaffe HL. Chondrosarcoma of bone. **Am J Pathol** 1943; 19:553-89.

Marcove RC, Mike V, Hutter RV, et al. Chondrosarcoma of the pelvis and upper end of the femur: an analysis of factors influencing survival time in 113 cases. **J Bone Joint Surg Am** 1972; 54A:561-72.

Marcove RC. Chondrosarcoma: diagnóstico y tratamiento. **Orthop Clin North Am** 1977; 8:811-20.

Maula S, Huuhtinen RL, Blomqvist CP, et al. The molecule CD44v6 is associated with a high risk for local recurrence in adult soft tissue sarcomas. **Br J Cancer** 2001; 84:244-52.

McFarland GB, Jr, McKinley LM, Reed RJ. Differentiation of low grade chondrosarcoma. **Clin Orthop Relat Res** 1971; (122):157-64.

Monaghan H, Bubb VJ, Sirimujalin R, Millward-Sadler S, Salter D. Adenomatous polyposis coli (APC), β -catenin, and cadherin are expressed in human bone and cartilage. **Histopathology** 2001; 39:611-9.

Mori K, Chano T, Kushima R, et al. Expression of E-cadherin in chordomas: diagnostic marker and possible role of tumor cell affinity. **Virch Arch** 2002; 440:123-7.

Naor D, Nedvetzki S. CD44 in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther** 2003; 5:105-15.

O'Neal LW, Ackermann LV. Chondrosarcoma of bone. **Cancer** 1952; 5:551-54.

Peto R, Pike MC, Armitage P, et al. Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. analysis and examples. **Br J Cancer** 1977; 35:1-39.

Pritchard DJ, Lunke RJ, Taylor WF, Dahlin DC, Medley BE. Chondrosarcoma: a clinicopathologic and statistical analysis. **Cancer** 1980; 45:149-57.

Próspero JD. **Tumores ósseos**. São Paulo: Roca; 2001. Condrossarcoma; p.74-91.

Rosenberg A. Bones, joints, and soft tissue tumors. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, editors. **Robbins pathologic basis of disease**. 6th ed. Hardcover: W. B. Saunders; 1999. p.1215-68.

Rowlands TC, Symonds M, Farookhi R. Cadherins: crucial regulators of structure and functions in reproductive tissues. **Rev Reproduc** 2000; 5:53-61.

Sell S. Cancer markers. In: Moossa AR, Schemper SC, Robson MC, editors. **Comprehensive text-book of oncology**. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p.225-38.

Schajowicz F, Ackerman LV, Sisson HA. **Histological typing of bone tumours**. Geneva: World Health Organization; 1972. (International histological classification of tumours, nº 6).

Schajowicz F. **Neoplasias ósseas e lesões pseudotumorais**. Trad. de N. D. Pereira. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. Tumores produtores de tecido cartilaginoso: condrossarcoma; p.201-44.

Unni KK. **Dahlin's bone tumors: general aspects and data on 11,087 cases**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. Chondrosarcoma: primary, secondary, dedifferentiated, and clear cell; p.71-108.

Vleminckx K, Vakaet L, Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. **Cell** 1991; 66:107-19.