

**ELINÊS OLIVA MACIEL**

**Análise da Expressão Imunoistoquímica do Fator Tecidual no  
Tumor de Wilms e sua relação com Angiogênese e  
Aspectos Clínico-patológicos**

**Área de Concentração: Cirurgia**

**Orientador: Gustavo Franco Carvalhal**

**Co-orientador: Vinícius Duval da Silva**

**Porto Alegre, 2007**

**ELINÊS OLIVA MACIEL**

**Análise da Expressão Imunoistoquímica do Fator Tecidual no  
Tumor de Wilms e sua relação com Angiogênese e  
Aspectos Clínico-patológicos**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande  
do Sul, para a obtenção do título de Doutor em  
Medicina e Ciências da Saúde – Área de  
Concentração: Cirurgia.**

**Porto Alegre, 2007**

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

M152a Maciel, Elinês Oliva

Análise da expressão imunoistoquímica do fator tecidual no tumor de Wilms e sua relação com a angiogênese e aspectos clínicos patológicos / Elinês Oliva Maciel; orient. Gustavo Franco Carvalhal; co-orient. Vinicius Duval da Silva. Porto Alegre: PUCRS; 2008.

83f.: gráf. il. tab.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Cirurgia.

1. ANGIOGÊNESE. 2. TROMBOPLASTINA. 3. FATOR TECIDUAL. 4. TUMOR DE WILMS. 5. NEFROBLASTOMA. 6. IMUNOISTOQUÍMICA. 7. ANÁLISE DE SOBREVIDA. 8. ANÁLISE MULTIVARIADA. 9. INFÂNCIA. 10. PROGNÓSTICO. 11. ESTUDOS DE COORTES. I. Carvalhal, Gustavo Franco. II. Silva, Vinicius Duval da. III. Título.

C.D.D. 616.99461

C.D.U. 616.61-053.2:576.385.5(043.2)

N.L.M. WJ 358

## **DEDICATÓRIA**

Ao Paulo, meu esposo e grande amigo, meu apoio e incentivo,  
em horas de euforia e de desânimo, que compreendeu  
e ajudou em todos os momentos.

Aos meus Pais e familiares, que com seu carinho e estímulo  
contribuíram decisivamente para minha profissão.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao Dr. Gustavo Franco Carvalhal,  
amigo, orientador e incentivador deste projeto e da  
Pós-graduação em Cirurgia da PUCRS.

Ao Dr. Vinícius Duval da Silva, meu co-orientador,  
companheiro e pesquisador exemplar.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus colegas da Cirurgia Pediátrica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e do Hospital Criança Conceição, que me substituíram em muitas das minhas tarefas com competência e compreensão, possibilitando o tempo tão necessário para o desenvolvimento desta tese, o meu agradecimento pela amizade, apoio e entusiasmo.

Ao Dr. Mário Rafael Carbonera, exemplo de profissional e amigo, sempre pronto a ajudar com sua vasta experiência no tratamento dos tumores na criança e ao Dr. João Alberto Grimm, que me ajudaram na compilação dos dados dos pacientes do Hospital da Criança Conceição.

Ao Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS e do Hospital Criança Conceição pela ajuda na obtenção do material de pesquisa.

À Dra. Ana Maria Geiger pela eficiência, disposição e amizade no auxílio para a realização das lâminas para o estudo imunoistoquímico deste projeto.

Aos Dr. Lúcio Fillmann e Marcelo Toneto, companheiros no estudo da angiogênese, pela amizade e estímulo nas horas de desânimo.

À Faculdade de Medicina da PUCRS e ao Hospital São Lucas, que me ofereceram a oportunidade para a realização deste curso de pós-graduação e para o desenvolvimento de minha profissão.

A todos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram em todas as etapas desta tese.

## SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Tumor de Wilms .....	3
2.1.1 Caracterização da Doença .....	4
2.1.2 Histologia .....	6
2.1.3 Estagiamento .....	10
2.1.4 Aspectos da Biologia Molecular no Tumor de Wilms .....	12
2.2 Angiogênese .....	13
2.3 Fator Tecidual.....	24
2.3.1 Fator Tecidual e Angiogênese.....	26
3 OBJETIVOS.....	32
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	33
4.1 Delineamento, População e Amostra.....	33
4.1.1 Imunoistoquímica .....	33
4.1.2 Análise Digital das Imagens.....	34
4.2 Fatores de Exclusão .....	35
4.3 Variáveis Principais.....	36
4.3.1 Idade .....	36

4.3.2 Histologia .....	36
4.3.3 Estagiamento .....	37
4.3.4 Expressão imunoistoquímica da angiogênese .....	37
4.3.5 Expressão imunoistoquímica do fator tecidual.....	39
4.3.6 Recidivas (recorrência local e/ou metástases à distância).....	40
4.3.7 Óbitos .....	40
4.4 Análise Estatística.....	40
4.5 Ética.....	41
5 RESULTADOS .....	43
5.1 Caracterização da Amostra.....	43
5.1.1. Idade .....	45
5.1.2 Histologia .....	47
5.1.3 Estagiamento .....	49
5.2 Densidade Microvascular .....	51
5.3 Expressão do Fator Tecidual .....	54
5.4 Análise Multivariada .....	63
6 DISCUSSÃO .....	64
7 CONCLUSÕES .....	71
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
ANEXOS	



**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

<b>BW</b>	Síndrome de Beckwith-Weidemann
<b>COG</b>	Grupo de Oncologia Pediátrica
<b>DMV</b>	Densidade microvascular
<b>e cols.</b>	e colaboradores
<b>EGF</b>	Fator de Crescimento Epidérmico
<b>FGF</b>	Fator de Crescimento do Fibroblasto
<b>FT</b>	Fator Tecidual
<b>GCBTTW</b>	Grupo Cooperativo Brasileiro Para o Tratamento do Tumor de Wilms
<b>HD</b>	Histologia Desfavorável
<b>HF</b>	Histologia Favorável
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator Indutor de Hipóxia 1 $\alpha$
<b>IFN</b>	Interferon
<b>NWTS</b>	“National Wilms Tumor Study”
<b>PCR-RT</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<b>PF4</b>	Fator Plaquetário 4
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido Ribonucléico mensageiro
<b>SIOP</b>	Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica
<b>TGF</b>	Fatores de Crescimento Transformadores
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>TW</b>	Tumor de Wilms
<b>UKCCSG</b>	Grupo de Estudo do Câncer da Criança no Reino Unido
<b>VEGF</b>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
<b>vWF</b>	Fator de von Willebrandt
<b>WAGR</b>	Síndrome com associação de TW, aniridia, malformações genito-urinárias e retardo mental
<b>WT1</b>	Gene supressor tumoral (“wilms tumor 1”)

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sobrevida do tumor de Wilms do SIOP-9. ....	5
Tabela 2. Classificação dos tumores renais SIOP-9. ....	9
Tabela 3. Estadiamento do tumor de Wilms. ....	11
Tabela 4. Estimuladores e inibidores endógenos da angiogênese. ....	16
Tabela 5. Características clínicas e anátomo-patológicas da amostra (N=41). ....	44
Tabela 6. Correlação entre a presença de tipos histológicos e óbito / recidiva tumoral. ....	48
Tabela 7. Expressão do fator tecidual total em espécimes de Tumor de Wilms. ....	54
Tabela 8. Comparação dos grupos de estadiamento I+II vs III+IV quanto à idade, fator tecidual e número de microvasos no “hotspot” de pacientes com tumor de Wilms, Porto Alegre, RS, 2007. ....	56
Tabela 9. Comparação dos grupos de patologia de alto risco e risco baixo+intermediário quanto à idade, fator tecidual e número de microvasos no “hotspot” de pacientes com tumor de Wilms, Porto Alegre, RS, 2007. ....	57
Tabela 10. Comparação dos grupos com e sem recidiva quanto à idade, fator tecidual e número de microvasos no “hotspot” de pacientes com tumor de Wilms, Porto Alegre, RS, 2007. ....	58
Tabela 11. Comparação dos grupos óbito e sobrevivência quanto à idade, FT e número de microvasos no “hotspot” de pacientes com tumor de Wilms, Porto Alegre, RS, 2007. ....	59
Tabela 12. Fatores associados com a ocorrência de óbito expressos por risco relativo (RR) e seu intervalo de confiança de 95% (IC95%). ....	63

## LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tumor de Wilms trifásico (blastema, estroma e elementos epiteliais). .....	7
Figura 2. Tumor de Wilms com anaplasia.....	8
Figura 3. Organograma utilizado pela SIOP- 2001. ....	9
Figura 4. Angiogênese no desenvolvimento, crescimento e metastatização.....	15
Figura 5. Imagem do software de captura do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS. ....	35
Figura 6. Expressão imunohistoquímica da angiogênese no tumor de Wilms(“hot spot”).....	38
Figura 7. Expressão imunohistoquímica da angiogênese no tumor de Wilms.....	38
Figura 8. Expressão do fator tecidual no tumor de Wilms (Categoria IV).....	39
Figura 9. Expressão do fator tecidual no tumor de Wilms (Categoria I).....	40
Figura 10. Curva de sobrevida geral dos pacientes. ....	45
Figura 11. Gráfico de “boxplot” representando a diferença da idade (anos) entre os grupos que sobreviveram (n=27) e que foram ao óbito (n=14). ....	46
Figura 12. Curvas de sobrevida em relação à mediana das idades (2,58 anos).....	47
Figura 13. Comparação entre mortalidade e histologia favorável e desfavorável (NWTS).....	48
Figura 14. Curvas de sobrevida em relação à categoria de risco (SIOP-9).....	49
Figura 15. Gráfico de barras representando o percentual da recidiva tumoral em cada um dos estágios. ....	50
Figura 16. Representação gráfica do percentual de óbitos em cada um dos estágios. ....	50
Figura 17. Curvas de sobrevida por estagiamento da SIOP-9 do tumor de Wilms.....	51
Figura 18. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre a DMV nas categorias de risco da SIOP-9 (risco alto e intermediário/baixo).....	52
Figura 19. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre a DMV nos estágios (foram agrupados os estágios I e II e os estágios III e IV).....	52

Figura 20. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre a DMV nas recidivas tumorais. ....	53
Figura 21. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre a DMV e o óbito.....	53
Figura 22. Curvas de sobrevida para pacientes com alta ( $\geq 47,5$ microvasos/campo) e baixa ( $< 47,5$ microvasos/campo) densidade microvascular em relação à mediana.....	54
Figura 23. A expressão intensa do fator tecidual no componente blastematoso e expressão fraca no componente estromal.....	55
Figura 24. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o fator tecidual nos diferentes estadiamentos da SIOP-9 (foram agrupados os estágios I e II e os estágios III e IV).....	56
Figura 25. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o fator tecidual nas categorias de risco da SIOP-9 (risco alto e intermediário/baixo). ....	57
Figura 26. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o fator tecidual nas recidivas tumorais. ....	58
Figura 27. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o fator tecidual e o óbito.....	59
Figura 28. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o fator tecidual expresso no blastema e óbito.....	60
Figura 29. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o FT expresso nos diferentes escores (I a IV) e a DMV.....	60
Figura 30. Representação gráfica da expressão de FT e da densidade microvascular nos grupos com e sem quimioterapia pré-operatória. ....	61
Figura 31. Expressão do fator tecidual Categoria IV. ....	62
Figura 32. Curvas de sobrevida para pacientes com alta expressão (III e IV) e baixa expressão (I e II) do fator tecidual.....	62

## RESUMO

O Tumor de Wilms (TW) é o tumor sólido renal mais comum na criança. Apesar do bom prognóstico na maioria dos casos, muitos pacientes com doença de histologia favorável apresentam recidiva e evoluem para óbito. Tem-se buscado na biologia molecular a identificação de fatores de prognóstico mais efetivos para estas crianças. O fator tecidual (FT), uma proteína de membrana celular ligada ao desencadeamento da cascata da coagulação parece ser fundamental para a progressão de neoplasias malignas através da ativação do processo de angiogênese. A expressão do FT foi associada ao desenvolvimento de metástases e a um pior prognóstico em vários tipos tumorais. Descrevemos pela primeira vez a expressão do FT em espécimes fixados em parafina de tumores de Wilms obtidos de 41 pacientes operados no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e no Hospital da Criança Conceição de Porto Alegre e comparamos a intensidade da sua expressão com a densidade microvascular (DMV), critérios de prognóstico estabelecidos (idade, estadiamento e histologia), recidivas tumorais e sobrevida geral. Encontramos correlação positiva entre a expressão do FT e a recidiva dos tumores e entre a expressão do FT e o óbito. Não encontramos correlação significativa entre a expressão de FT e os outros fatores de prognóstico estabelecidos, bem como com a DMV.

Na análise multivariada o FT permanece como um fator independente de prognóstico para uma maior mortalidade.

## ABSTRACT

Wilms tumor is the most common solid renal malignancy in childhood. Even among patients with favorable histology and staging, some recur and eventually die from the disease. Novel prognostic factors could be especially useful in the management of these children. Tissue factor (TF), a protein linked to the extrinsic coagulation pathway, is highly expressed in various tumors, and has been associated to the development of metastases and to a poor prognosis. Our study describes, for the first time, the expression of TF in paraffin-fixed specimens of Wilms tumors from 41 patients treated at Hospital São Lucas da PUCRS and Hospital da Criança Conceição, Porto Alegre. The immunohistochemical expression of TF was compared to microvascular density (MVD) and to other established prognostic criteria, such as age, staging, histology, tumor recurrence, overall and cancer-specific mortality. Increased TF expression was correlated to a higher risk of tumor recurrence and death. However, there was no significant correlation between TF expression and other established prognostic factors. Likewise, TF expression was not correlated to an increased MVD.

In multivariate analysis TF expression remain as a independent prognostic factor to a higher risk of death.

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da importante melhora na taxa de sobrevida dos pacientes com tumor de Wilms (TW) com o uso de quimioterapia intensiva e radioterapia, persistem os efeitos colaterais agudos e tardios advindos destas terapias (pancitopenia, enterite, cistite, hemorragias e septicemia, infertilidade, retardo do desenvolvimento mental, insuficiência renal e/ou cardíaca e neoplasias secundárias). Por estas razões, o desenvolvimento de novas terapêuticas para os TW se torna relevante.<sup>1,2,3</sup> O TW necessita ainda da identificação de fatores prognósticos que permitissem uma maior individualização do tratamento dos pacientes para monitorizar a atividade tumoral e reduzir o emprego da radioterapia e quimioterapia nos casos favoráveis.

O estadiamento e a histologia são os fatores prognósticos mais importantes nos TW, sendo utilizados para a definição do tratamento. Contudo, um subgrupo de pacientes com histologia favorável (HF) apresenta recidivas e doença agressiva resistente às terapias conhecidas, evoluindo para progressão e óbito.<sup>4,5</sup>

A base biológica desta má evolução eventual em crianças com tumores de HF ainda não foi bem esclarecida, mas estes pacientes têm sido investigados intensamente pelos grupos de estudos cooperativos internacionais, principalmente pelo “National Wilms Tumor Study” (NWTS) e pela Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (SIOP).

O NWTS-5 incorporou vários fatores adicionais de mau prognóstico. Uma das alterações moleculares que têm sido sugeridas como importante indicativa de evolução adversa em pacientes com TW de histologia favorável é a perda do alelo 1q e 16q<sup>6</sup>; entretanto, a perda do alelo no NWTS-5 está presente em apenas um terço dos pacientes que recidivaram.<sup>5</sup> A expressão do gene supressor WT blastematoso (WT1) é considerada um marcador prognóstico independente para a progressão da doença,<sup>7</sup> enquanto que outros estudos têm associado um pior prognóstico à super-expressão do gene supressor tumoral p53.<sup>8,9</sup>

Está bem estabelecido que o crescimento e as metástases dos tumores sólidos são dependentes da angiogênese, mas que os fatores reguladores da angiogênese podem diferir entre os tumores. Em um estudo experimental, Kim<sup>10</sup> e cols. mostraram que a angiogênese é

regulada de maneira distinta em neuroblastoma e em TW. Estes tumores apresentam diferentes padrões de metástases, invasão e respostas à terapêutica, e apesar de ambos tumores expressarem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) o neuroblastoma é efetivamente menos bloqueado pelo anti-VEGF do que o TW. O padrão da rede vascular mostrou-se diferente entre estes dois tumores, provavelmente porque o recrutamento de vasos sanguíneos tumorais utilizou mecanismos alternativos. O neuroblastoma influenciado pelo anti-VEGF mostrou que os vasos sofriam alterações, denominadas por Kim de corpos vasculares terminais e que estas alterações desapareciam após o término do agente antiangiogênico. Tratado com o anti-VEGF, o TW mantinha sua arquitetura vascular, porém com redução do número de vasos. Estes achados apóiam o conceito de que a regulação da angiogênese varia de um tumor para o outro e sugere que as mesmas terapias antiangiogênicas podem não ser efetivas para todos os tumores.<sup>10</sup> Alguns tumores agregam inicialmente os vasos sanguíneos locais para formação da rede neovascular a qual depende de um complexo relacionamento entre fatores associados ao tumor e células circundantes normais. Como a angiogênese tem sido reconhecida como um indicador de mau prognóstico em TW,<sup>10,11</sup> correlacionando-se com a presença de metástases, a neovascularização parece ser um processo importante na transformação de um resto nefrogênico (potenciais precursores do TW) em um tumor maligno.

O fator tecidual (FT) apresenta um papel bem definido no mecanismo hemostático, mas parece estar envolvido ainda em uma série de outros processos celulares, tais como a proliferação celular e a angiogênese.<sup>12,13</sup> Atualmente, acredita-se que o FT desempenha uma função essencial no processo de tumorigênese sendo regulador da angiogênese em vários tumores, como foi demonstrado inicialmente em sarcomas<sup>14</sup> e após em carcinomas de próstata,<sup>15,16</sup> de cólon,<sup>17</sup> estômago,<sup>18</sup> pulmão do tipo não pequenas células,<sup>19</sup> pâncreas<sup>20</sup> e melanoma.<sup>21</sup> Aparentemente, a expressão do FT possibilita um aumento da taxa de crescimento tumoral e da neovascularização mediada parcialmente pela produção concomitante do VEGF e pela redução da trombospondina 2.<sup>14,22</sup>

O estudo sobre a expressão do FT em TW poderia fornecer dados importantes sobre sua aplicabilidade como um potencial marcador de prognóstico, com vistas a uma maior individualização das terapêuticas atuais.<sup>16,23,24,25,26,27,28</sup>



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Tumor de Wilms

Em 1814, Rance descreveu a presença de tumores renais na criança referindo-se aos mesmos como uma neoplasia renal,<sup>29</sup> mas a descrição patológica clássica foi feita por Eberth em 1872.<sup>30</sup> Três anos após, Cohnheim descreveu um tumor renal pediátrico, chamando-o de sarcoma congênito do rim. Em 1879, William Osler reconheceu que Eberth, Cohnheim e outros médicos haviam descrito os mesmos tumores renais, apenas com diferentes denominações, como sarcoma embrionário, sarcoma renal, sarcoma muscular entre outras. Em 1899, Carl Max Wilhelm Wilms, um cirurgião alemão, escreveu uma monografia detalhada sobre os tumores sólidos renais da infância, adicionando à literatura existente sete casos. Sua descrição do quadro clínico foi tão precisa que se passou a utilizar o epônimo “*tumor de Wilms*”, em voga até o momento.<sup>29,30,31</sup>

A excisão cirúrgica era o único tratamento disponível para estes tumores até 1915, quando Friedlander passou a adicionar a radioterapia ao tratamento. Nesta época, com a alta mortalidade cirúrgica, a sobrevida variava em cerca de 5-6%. A mortalidade trans-operatória diminuiu quando Ladd refinou a técnica cirúrgica na década de 40, elevando a sobrevida destes tumores para 20%. O uso de quimioterapia citotóxica no tratamento do TW iniciou em 1954, com actinomicina D. Em 1956, Farber introduziu a era do tratamento moderno do TW, combinando cirurgia, radioterapia pós-operatória e quimioterapia, conseguindo uma sobrevida em 2 anos de 81%.<sup>30,31</sup> Em 1969, vários grupos de estudo da oncologia nos Estados Unidos, reuniram-se para formar o “National Wilms Tumor Study” (NWTs), que visava a obtenção de uma casuística maior que permitisse criar recomendações que auxiliassem no manejo destas crianças.

Os avanços no tratamento do Tumor de Wilms devem-se especialmente à formação destes grupos cooperativos multi-institucionais: nos Estados Unidos, o NWTs, na Europa o grupo da “Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica” (SIOP), na Inglaterra o “United Kingdom Childrens’ Cancer Study Group” (UKCCSG) e no Brasil o “Grupo Cooperativo

Brasileiro para o Tratamento do Tumor de Wilms” (GCBTTW), iniciado em 1986. Os grupos cooperativos têm contribuído para a padronização do tratamento e para a melhoria da sobrevida.<sup>3,32,33,34</sup> A maioria dos TW são tratados usando os protocolos criados pela SIOP ou NWTS.

Em 2000, os quatro maiores grupos cooperativos para o estudo dos tumores pediátricos dos Estados Unidos (o NWTS, o Intergrupo para estudo do Rabdomyosarcoma, o Grupo de Oncologia Pediátrica e o Grupo de Câncer Pediátrico) juntaram-se e formaram um grande grupo cooperativo, chamado de Grupo de Oncologia Pediátrica (“Children’s Oncology Group” - COG) para um tratamento mais racional e centralizado dos tumores da criança.<sup>35</sup>

### 2.1.1 Caracterização da Doença

O TW, também conhecido como nefroblastoma ou embrioma renal, é o segundo tumor abdominal sólido da infância em frequência e afeta principalmente crianças com idades entre um e quatro anos, com uma média de três anos.<sup>36,37</sup> No GCBTTW a idade variou de 15 dias a 22 anos, com uma mediana de 36 meses, média de 44,9 meses e desvio padrão de 36,6 meses.<sup>29,32</sup> Setenta e cinco por cento dos pacientes estão abaixo de cinco anos e 90% abaixo de sete anos ao diagnóstico, sendo o TW raro no recém-nascido e no adulto.<sup>36,37</sup> No GCBTTW os sexos foram igualmente afetados e a raça predominante foi a branca com 66,6%.<sup>32,33,34</sup> Atualmente tem-se dado mais valor às variações de idade entre os sexos, à associação com outras anomalias congênitas e à presença de lesões precursoras do nefroblastoma (p.ex., nefroblastomatose). Dados obtidos da SIOP e do NWTS mostram que pacientes do sexo feminino são em média seis meses mais velhos do que os do sexo masculino e que os de raça negra são significativamente mais velhos do que os da raça branca e os asiáticos. A associação com anomalias congênitas, como hemihipertrofia, aniridia, síndrome de Beckwith-Wiedmann e outras, é útil para identificar formas hereditárias do TW, sendo que o aparecimento do tumor nestes casos é mais precoce do que nos pacientes com tumores isolados.<sup>36,37</sup>

As sobrevidas globais após um, dois e quatro anos para todos os pacientes admitidos no primeiro GCBTTW (1986-94) foram respectivamente, de 88%, 80% e 73% e os resultados do estudo do SIOP-9 aparecem na Tabela 1.<sup>3</sup>

**Tabela 1. Sobrevida do tumor de Wilms do SIOP-9.**

<b>Estadiamento</b>	<b>Histologia</b>	<b>Sobrevida livre de doença (2 anos)</b>	<b>Sobrevida (5 anos)</b>
<b>I</b>	Favorável	100%	100%
<b>I</b>	Favorável, anaplasia	88%	93%
<b>II N0</b>	Favorável	84%	88%
<b>II N1 e III</b>	Favorável	71%	85%
<b>II e III</b>	Anaplasia	71%	71%

N0= sem envolvimento de linfonodo, N1= com envolvimento de linfonodo

Fonte: Graf N, Tournade MF, Kraker J. Urol Clin N Am 27(3): p 443-54, 2000

Existe uma diferença filosófica no tratamento do Tumor de Wilms entre os dois maiores grupos cooperativos internacionais (NWTS e SIOP). O NWTS recomenda cirurgia primária antes de quimioterapia adjuvante ou radioterapia, enquanto a SIOP baseia-se no uso de quimioterapia neoadjuvante. Ambos os grupos usam a quimioterapia neoadjuvante para pacientes com tumores bilaterais, tumores em rim único, tumores com invasão da veia cava inferior acima das veias hepáticas e tumores irredutíveis durante a exploração cirúrgica.<sup>1</sup> Existe controvérsia em manejar um tumor irredutível com diagnóstico apenas em imagem, sendo que o NWTS recomenda exploração cirúrgica deste tumor para definir a ressecabilidade do mesmo. A SIOP recomenda rotineiramente o uso de quimioterapia neoadjuvante, sem biópsia, seguida de nefrectomia e, após, quimioterapia pós-operatória e/ou radioterapia dependendo do estadiamento do tumor. Existem relatos de maior risco de ruptura do tumor, independentemente do tamanho do mesmo, com piora do estadiamento em crianças submetidas à nefrectomia primária.<sup>3</sup>

A exclusão da biópsia pré-quimioterapia deve-se ao relato de recorrência tumoral no local da biópsia, o que não foi ratificado em uma revisão de 78 pacientes diagnosticados por biópsia percutânea (com “trucut”), nos quais não houve nenhuma recorrência no local da

punção. Atualmente indica-se biópsia com agulha fina para confirmação da histologia em crianças com apresentação clínica não habitual, maiores de cinco anos, com infecção urinária, septicemia ou inflamação do psoas junto ao tumor ou achados de imagem não habitual como calcificação abundante, volumosas adenopatias, massa extra-renal ou parênquima renal não identificado.<sup>1,2,32</sup>

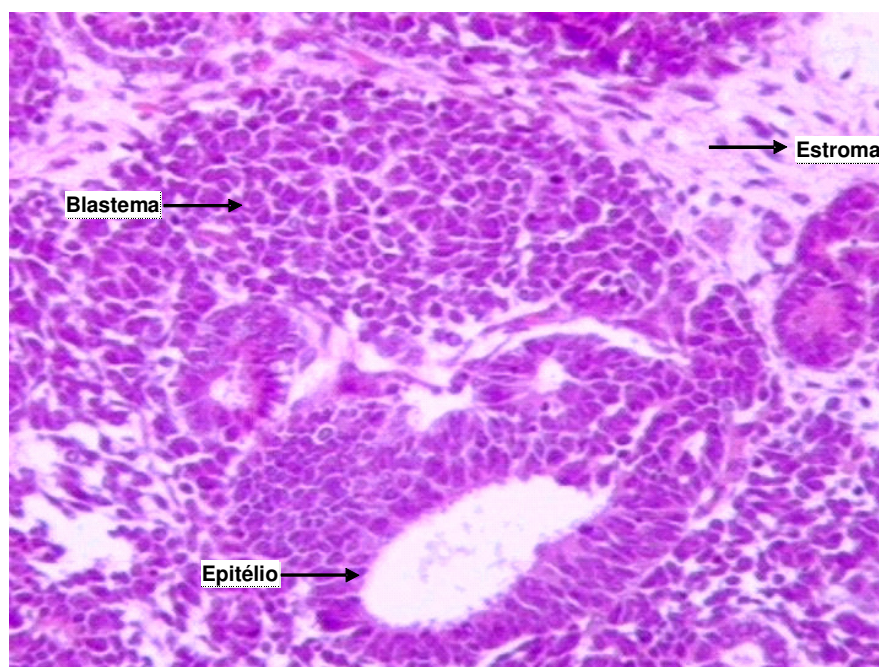
Apesar dos protocolos da SIOP e NWTs serem diferentes na abordagem e tratamento, os resultados são similares.

### **2.1.2 Histologia**

Os TW são unicêntricos na sua maioria, entretanto massas multicêntricas em um rim e lesões primárias bilaterais são observadas em 7% dos casos. Os TW são usualmente massas arredondadas bem demarcadas do parênquima renal adjacente através de uma pseudocápsula fibrosa peritumoral. Apresentam cor que varia de um cinza claro até intenso e com consistência elástica, tornando-se mais firme nas lesões compostas em sua maioria por elementos estromais maduros.<sup>38</sup> O clássico tumor de Wilms é composto de blastema, estroma e elementos epiteliais (trifásico), podendo ainda apresentar dois componentes (bifásico) ou apenas um deles, com ou sem anaplasia.<sup>35</sup> As células do blastema são pequenas, indiferenciadas e com atividade mitótica. Estas células podem ocorrer de modo difuso com perda da aderência celular e um padrão agressivo com invasão adjacente dos vasos e tecido conectivo, em contraste com as características típicas bem circunscritas, encapsuladas e bordo delimitado da maioria dos TW. O padrão blastematoso nodular ou em serpentina é caracterizado por cordões de um estroma frouxo envolvendo as células de blastema. O componente epitelial de diferenciação está presente na maioria dos TW. Este padrão manifesta-se por estruturas primitivas que são reconhecidas como formas dos túbulos precoces ou células de elementos papilares ou tubulares em vários estágios da nefrogênese normal. O padrão estromal pode ocorrer e dificulta sua identificação quando a diferenciação epitelial ou blastematosas estão ausentes.<sup>35,38</sup>

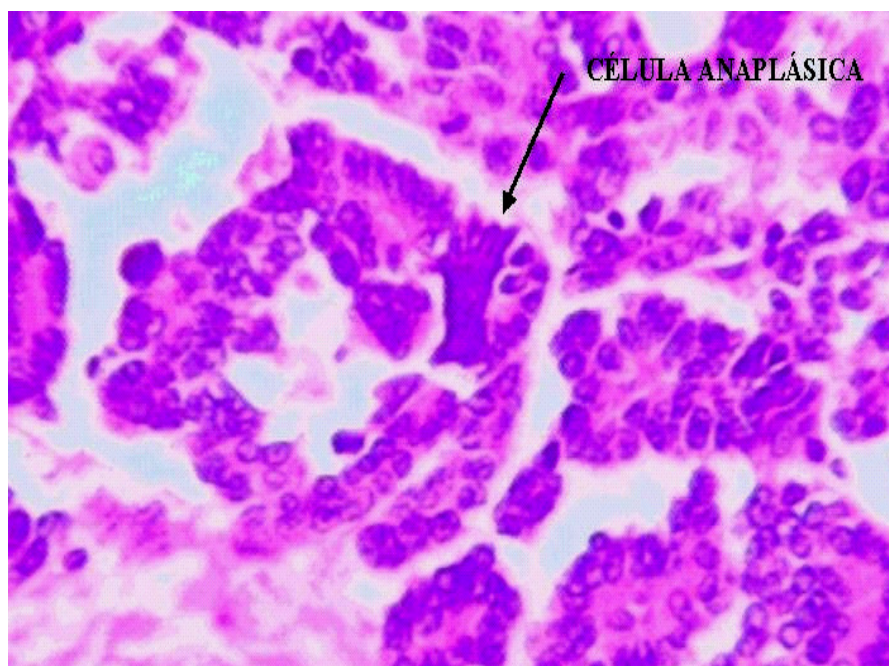
O padrão histológico prevalente é de histologia favorável (HF) em aproximadamente 89% dos casos, sendo que a histologia desfavorável (HD) está presente em 11% dos casos, conforme a classificação do NWTS.

**Histologia favorável:** Mimetiza o desenvolvimento de um rim normal, consistindo dos três componentes: blastema, epitélio (túbulos) e estroma. Não apresenta anaplasia. O tipo blastematoso apresenta um pior prognóstico em relação ao epitelial, com uma recidiva mais freqüente.<sup>29,37</sup>



**Figura 1. Tumor de Wilms trifásico (blastema, estroma e elementos epiteliais).**

**Histologia desfavorável:** Contêm células anaplásicas, focais ou difusas, e núcleos hiper Cromáticos, sendo que muitas vezes apresentam mitoses multipolares. Anaplasia focal parece conferir um melhor prognóstico do que a anaplasia difusa. A anaplasia (pleomorfismo celular e atipia difusa) está associada mais com resistência à quimioterapia, que pode ser detectada após a quimioterapia pré-operatória sem resposta,<sup>37,39</sup> do que com agressividade.<sup>38</sup>



**Figura 2. Tumor de Wilms com anaplasia.**

#### **Classificação dos Tumores Renais (revisada pela SIOP-9 - 2001)**

As mudanças após quimioterapia incluem necrose, fibrose, depósitos de hemosiderina, maturação dos componentes do blastema, epiteliais e estromais, com músculo estriado aparecendo com maior frequência. Uma resposta excelente à quimioterapia pode levar à necrose completa em alguns tumores, enquanto que outros tumores sem resposta ao tratamento têm um pior prognóstico.<sup>35,38</sup> A SIOP baseou-se na correlação entre os achados histológicos e a sobrevida dos pacientes, classificando os tumores renais como: de baixo risco, risco intermediário e alto risco. (Tabela 2)<sup>7,33,34</sup> O nefroma mesoblástico, o sarcoma de células claras e o tumor rabdóide representam entidades à parte do TW, mas foram incluídos na classificação da SIOP por serem tumores típicos da infância. Como não são mais considerados como uma variante do tumor de Wilms devido as suas características clínicas e histopatológicas diferentes, foram excluídos desta pesquisa.<sup>39</sup> Ao lado da anaplasia três outros tipos foram incluídos devido ao resultado do tratamento, são eles: o nefroblastoma completamente necrótico (baixo risco), o nefroblastoma com predomínio blastematoso (alto risco) e outros de risco intermediário (como o nefroblastoma regressivo).<sup>32,38</sup>

**Tabela 2. Classificação dos tumores renais SIOP-9.**

	<b>Baixo Risco</b>	<b>Risco Intermediário</b>	<b>Alto Risco</b>
<b>Quimioterapia neoadjuvante</b>	Nefroma mesoblástico	Nefroblastoma tipo epitelial	Nefroblastoma tipo blastematoso
	Nefroblastoma cístico p diferenciado	Nefroblastoma tipo estromal	Nefroblastoma com anaplasia difusa
	Nefroblastoma completamente necrótico	Nefroblastoma tipo misto	Sarcoma de células claras
		Nefroblastoma tipo regressivo	Tumor rabdóide renal
<b>Nefrectomia primária</b>	Nefroma mesoblástico	Nefroblastoma com anaplasia focal	
	Nefroblastoma cístico p diferenciado	Nefroblastoma não-anaplásico e suas variantes	Nefroblastoma com anaplasia difusa
		Nefroblastoma com anaplasia focal	Sarcoma de células claras
			Tumor rabdóide renal

Fonte: Graf N, Tournade MF, Kraker J. Urol Clin N Am 27(3): p 443-54, 2000

Para avaliação das peças histológicas pela classificação da SIOP-9 necessitamos utilizar o percentual de necrose e o elemento predominante, sendo o tumor considerado como misto quando não houver predominância de nenhum dos tipos, conforme organograma abaixo.

**Figura 3. Organograma utilizado pela SIOP- 2001.**

### 2.1.3 Estagiamento

O prognóstico do TW depende essencialmente do estagiamento e da histologia do tumor. O estagiamento do TW é um dos critérios mais importantes para o tratamento e para o prognóstico, mas sua acurácia ainda é um grande problema. O estagiamento clínico é determinado pelo cirurgião pediátrico durante a cirurgia e deve ser confirmado pelo patologista.

O estagiamento que é baseado no grau de extensão macro ou microscópico é o mesmo para tumores com histologia favorável ou desfavorável; por este motivo, os pacientes devem ser caracterizados por ambos os critérios (por exemplo: estágio II, histologia favorável ou estágio II, histologia desfavorável).

Os estagiamentos descritos pelo NWTS-3<sup>40,41</sup> e SIOP-9<sup>33,39</sup> são os mais utilizados e diferem muito pouco, mas o descrito pela SIOP acrescenta os dados que podem ser encontrados com o uso da quimioterapia pré-operatória.



**Tabela 3. Estadiamento do tumor de Wilms.**

	SIOP-9	NWTS-3
<b>ESTÁGIO I</b>	<p>A. Tumor restrito ao rim ou envolto por pseudocápsula fibrosa, quando fora dos contornos normais do rim. A cápsula renal pode estar infiltrada, mas não ultrapassada pelo tumor. Margens cirúrgicas livres.</p> <p>B. O tumor pode fazer protusão na pélvis ou no ureter, mas sem invadir suas paredes.</p> <p>C. Os vasos do seio renal não podem estar invadidos.</p> <p>D. Vasos intra-renais podem estar invadidos. Biópsia por agulha fina não muda o estadiamento do tumor. Presença de tumor necrótico ou de transformações induzidas pela quimioterapia no seio renal ou gordura peri-renal não elevam o estágio do tumor, desde que completamente ressecados.</p>	<p>Tumor limitado ao rim e completamente excisado. A cápsula renal deve estar intacta. Margens cirúrgicas livres. Não pode ter havido ruptura do tumor antes ou durante a excisão cirúrgica.</p> <p>Os vasos do seio renal não podem estar envolvidos.</p>
<b>ESTÁGIO II</b>	<p>A. O tumor se estende além do rim ou ultrapassa a cápsula renal, infiltrando gordura peri-renal, mas foi completamente ressecado. Margens livres.</p> <p>B. O tumor infiltra seio renal e/ou invade vasos sanguíneos e linfáticos fora do parênquima renal, mas foi completamente ressecado.</p> <p>C. O tumor infiltra órgãos adjacentes ou veia cava, mas foi completamente ressecado.</p>	<p>Tumor se estende além do rim, mas é completamente excisado. Nenhum tumor residual pode estar aparente. Não pode existir:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Extensão regional do tumor (penetração através da superfície externa da cápsula renal dentro do tecido peri-renal ou mais do que 1-2 mm de invasão do tumor no seio renal.</li> <li>2. Vasos fora do rim estão infiltrados ou contém trombo tumoral.</li> <li>3. O tumor foi biopsiado ou existe spillage local do tumor confinada ao flanco.</li> </ol>
<b>ESTÁGIO III</b>	<p>A. Ressecção incompleta do tumor que se estende além das margens</p> <p>B. Qualquer envolvimento de linfonodos abdominais</p> <p>C. Ruptura tumoral pré ou intra-operatória</p> <p>D. Infiltração tumoral na cavidade peritoneal</p> <p>E. Implantes tumorais no peritônio</p> <p>F. Trombo tumoral presente na margem de ressecção das veias ou ureter seccionado.</p> <p>G. Tumor foi submetido à biópsia em cunha antes da quimioterapia pré-operatória ou cirurgia. A presença de tumor necrótico ou transformações induzidas por quimioterapia em um linfonodo ou nas margens cirúrgicas são consideradas como prova de neoplasia prévia.</p>	<p>Tumor residual confinado ao abdômen. Um ou mais dos seguintes pode existir:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Linfonodos no hilo renal, cadeias peri-aórticas ou outra localização abdominal contém tumor na biópsia.</li> <li>2. Contaminação peritoneal difusa pelo tumor, tal como contaminação abdominal pelo tumor além do flanco, antes ou durante a cirurgia ou pelo crescimento do tumor que penetra através do peritônio.</li> <li>3. Implantes peritoneais.</li> <li>4. Tumor estende-se além das margens cirúrgicas micro ou macroscopicamente.</li> <li>5. Tumor não é completamente ressecável devido a infiltração local em estruturas vitais.</li> </ol>
<b>ESTÁGIO IV</b>	Metástases hematogênicas à distância (pulmão, fígado, ossos, cérebro) ou metástases para linfonodos além da região abdomino-peritoneal.	Metástases hematogênicas à distância (pulmão, fígado, ossos, cérebro).
<b>ESTÁGIO V</b>	Tumores bilaterais ao diagnóstico. Pode ser reclassificado separadamente de acordo com os achados cirúrgicos.	Tumores bilaterais ao diagnóstico.

Fonte: Metzger ML, Dome JS. Current therapy for Wilms' tumor. *Oncologist*. 2005;10(10):815-28.

#### 2.1.4 Aspectos da Biologia Molecular no Tumor de Wilms

Várias neoplasias malignas representam alterações genéticas, sendo que a compreensão da biologia molecular destas é fundamental para que o cirurgião pediátrico possa avaliar algumas doenças da criança, como a doença de Hirschsprung, síndromes polipóides intestinais e alguns tumores da infância, entre eles o TW. O TW cresce devido a modificações genéticas que levam à proliferação anormal das células tronco renais (blastema metanéfrico), havendo perda do controle do desenvolvimento com aumento no potencial tumorigênico.<sup>42</sup>

Do ponto de vista da biologia molecular, o fator mais surpreendente é a existência de formas esporádicas e familiares de TW, assim como no retinoblastoma, e o fato da bilateralidade ocorrer em 5 a 10% dos casos sugere uma predileção genética subjacente. Knudson postulou a presença de genes supressores tumorais em um modelo de retinoblastoma, sendo este modelo utilizado posteriormente para o TW.<sup>42,43,44</sup>

Aproximadamente 10% dos TW desenvolvem-se em associação com síndromes dismórficas bem características. Estas formas familiares do TW são associadas com a síndrome de aniridia, malformações genitourinárias e retardo mental (WAGR) e síndrome de Beckwith-Weidemann (BW). Analisando o cariótipo das crianças com a síndrome WAGR encontrou-se a deleção do braço curto do cromossoma 11 banda 13 (11p13)<sup>45</sup>, mostrando que nesta região situa-se o gene WT1, que foi confirmado em análises genéticas como um gene supressor tumoral, pois na presença dele existe variação no tamanho de algumas proteínas através da junção alternativa do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm).<sup>46</sup> Anormalidades envolvendo o WT1 são encontradas consistentemente em tumores da síndrome WAGR e também em tumores da síndrome Denys-Drash (pseudohermafroditismo, esclerose mesangial e 90% de risco de TW). Enquanto alterações do WT1 estão fortemente relacionadas ao desenvolvimento do TW em casos síndrômicos, seu papel em casos esporádicos é limitado, com somente um terço de todos TW mostrando deleção neste loco e apenas 10% com mutações do WT1.<sup>38,47</sup> O WT1 também forma um complexo com outro gene supressor tumoral, o *p53*, também aceito por muitos como envolvido na patogênese do TW.<sup>48</sup>

Na síndrome de Beckwith-Weidemann a alteração encontrada está no cromossoma 11p15 e foi designado de WT2 embora um gene específico não tenha sido identificado para o desenvolvimento do TW.<sup>38</sup> Embora a relação entre BW e TW seja desconhecida, o fator de crescimento epidérmico (IGF2), que é um gene indutor de crescimento embrionário, pode estar envolvido, pois sua super-expressão foi encontrada em alguns TW e no BW.<sup>49</sup>

A definição de um evento genético preciso como responsável pelo risco aumentado de desenvolvimento do TW permanece desconhecido, mas 1% dos pacientes com TW tem uma história familiar positiva para o mesmo tumor, sugerindo uma transmissão autossômica dominante com penetrância e expressividade variáveis.<sup>38</sup>

## **2.2 Angiogênese**

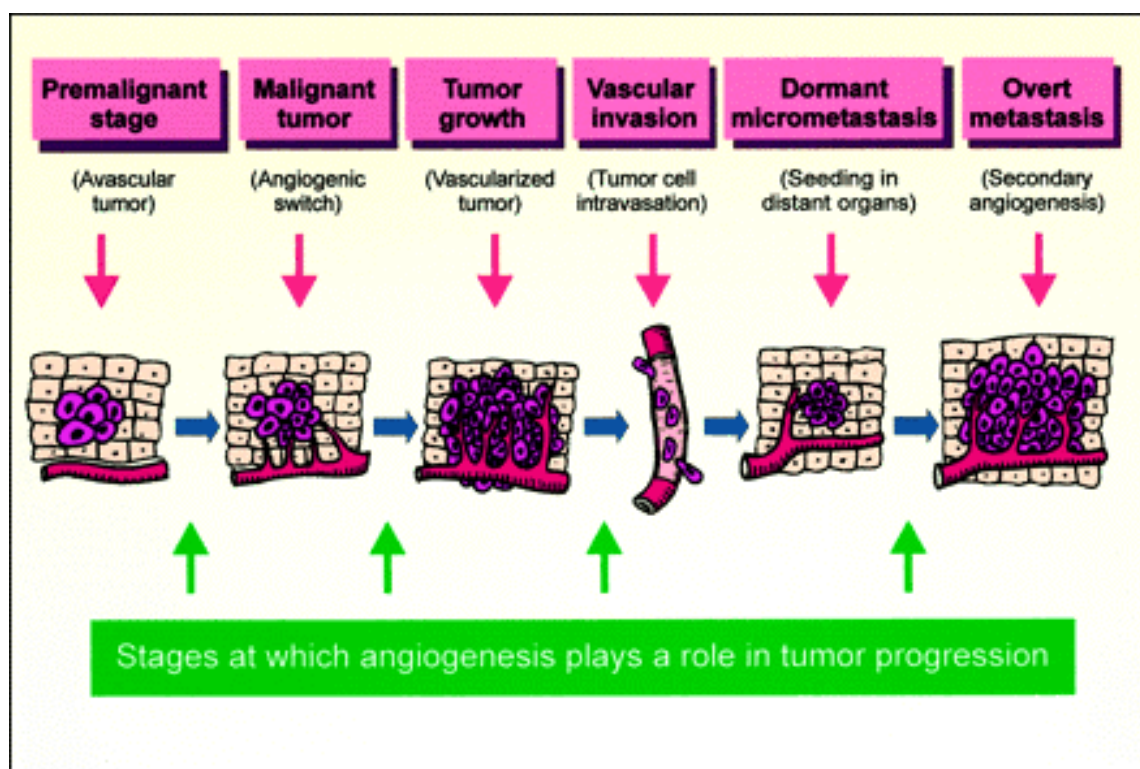
A angiogênese constitui um importante ponto de controle na progressão das neoplasias, havendo se tornado um foco de investigação. Sua inibição está surgindo como um instrumento racional para a terapia do câncer. Durante o desenvolvimento embrionário normal os vasos são formados através de tecido mesenquimal em um processo chamado vasculogênese. O processo da criação de novos vasos a partir de vasos já formados é chamado de angiogênese, a qual pode ser vista fisiologicamente no desenvolvimento fetal, na cicatrização de feridas, no ciclo menstrual com a proliferação do endométrio<sup>50</sup> e em situações patológicas como inflamação e isquemia.<sup>51</sup>

Foi Folkman,<sup>52</sup> em 1971, quem considerou a angiogênese como um pré-requisito para o crescimento de tumores sólidos e de metástases. Nas primeiras etapas do desenvolvimento tumoral não há envolvimento dos vasos neoformados, sendo que as divisões celulares patológicas que ocorrem permitem ao tumor atingir um tamanho de 2-3 mm. Quando a atividade angiogênica está ausente ou insuficiente, durante a fase pré-vascular, os tumores permanecem pequenos, porque existe um estado de equilíbrio constante onde a geração de novas células tumorais está equiparada ao alto índice de morte celular (apoptose). Em uma segunda fase, estes pequenos tumores adquirem uma capacidade de recrutar células endoteliais de vasos sanguíneos normais do tecido hospedeiro, formando novos capilares que circundam e

posteriormente permeiam a lesão, possibilitando o seu crescimento ilimitado.<sup>20,53</sup> Para o seu crescimento os tumores necessitam mutações que possibilitem o recrutamento de nutrientes e de oxigênio a partir da neovascularização (angiogênese).<sup>15,54</sup> A angiogênese pode ser induzida nos tecidos pela redução na tensão residual de oxigênio devido a um suprimento vascular insuficiente, tendo então o início do processo de hipóxia. A hipóxia tecidual induz a liberação de fatores de crescimento e desequilibra o processo normal de ajuste entre os fatores pró e antiangiogênicos, formando novos capilares no tumor, a partir de células endoteliais pré-existentes.<sup>52,55,56</sup> A hipóxia pode induzir a uma seleção natural, na qual células que são resistentes a estímulos apoptóticos (por exemplo, células com mutação do *p53*) sobrevivam, como também levar à ocorrência de alterações cromossômicas em sítios geneticamente instáveis, ocasionando a deleção de genes supressores tumorais e a amplificação de outros genes.<sup>15</sup>

A angiogênese é um pré-requisito para o desenvolvimento do estágio pré-maligno até o câncer invasivo, já que a neovascularização fornece nutrientes para o crescimento do tumor e facilita a circulação das células tumorais através dos vasos, possibilitando a disseminação. A angiogênese secundária é necessária para que o crescimento das micrometástases avasculares se transformem em metástases.<sup>57</sup>

A angiogênese associada à neoplasia é um processo caótico e irregular, resultando em vasos funcionalmente anormais, de diâmetros variados, com excessivas ramificações, distorções estruturais e alterações de parede, tais como fenestrações endoteliais, ampliação das junções interendoteliais e defeitos de membrana basal.<sup>51</sup> Tumores incapazes de induzir a angiogênese permanecem microscópicos ou de pequenas dimensões, sendo que tais lesões são indetectáveis a menos que estejam em locais visíveis como a pele, mucosa oral ou cérvice uterina.<sup>52,55</sup>



**Figura 4. Angiogênese no desenvolvimento, crescimento e metastatização.**

Fonte: Poon RT, Fan S, Wong J. Clinical Implications of Circulating Angiogenic Factors in Cancer Patients. J Clin Onc 2001; vol 19 (4): 1207-25

Múltiplos fatores que regulam o processo de angiogênese, em sinergia com outros ou sozinhos, foram identificados, sendo reconhecido que a neovascularização não depende apenas da perfusão, mas também do efeito parácrino, que resulta em produção de fatores de crescimento pelas células endoteliais, estimulando a proliferação e migração das células tumorais. A liberação destes fatores de crescimento não é suficiente para o início da atividade angiogênica tumoral, devendo ser acompanhada simultaneamente pela supressão dos inibidores locais da angiogênese os quais protegem o endotélio vascular do estímulo proliferativo.<sup>58</sup> As proteínas que regulam a angiogênese positivamente são conhecidas como fatores de crescimento angiogênico ou promotoras de angiogênese e as que regulam negativamente são as inibidoras da angiogênese. Tais proteínas são liberadas pelo tumor nos tecidos circundantes, estimulando novos vasos sanguíneos a crescerem intensamente a partir dos vasos saudáveis pré-existentes. Uma vez que os novos vasos sanguíneos atingem o tumor,

este pode crescer rapidamente e invadir órgãos adjacentes. As células tumorais podem então atingir a circulação através destes vasos e, se estas células fixarem-se em outros órgãos, surgirão metástases à distância (Tabela 4).<sup>55,59</sup>

**Tabela 4. Estimuladores e inibidores endógenos da angiogênese.**

<b>Fatores pró-angiogênese</b>	<b>Fatores antiangiogênese</b>
Angiopoetina-1	Angiopoetina-2
Angiogenina	Angiostatina
Fator de ativação plaquetária	Endostatina
Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)	Inibidores metaloproteinases
Fator de crescimento epidérmico (EGF)	Interferon alpha (IFN $\alpha$ )
Fatores de crescimento dos fibroblastos (FGF)	Interleucina-12
Fator estimulador do granulócito/macrófago	Trombospondina-1
Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )	Vasostatina
<b>Fator tecidual (FT)</b>	Fator plaquetário 4 (PF4)
Interleucina-8	Fator derivado da cartilagem
Prostaglandinas E <sub>1</sub> e E <sub>2</sub>	Fragmento 16 kd da prolactina
Fatores transformadores de crescimento	

Fonte: Toneto MG. Tese Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; Porto Alegre, 2006. 88 p.

Estas proteínas têm o poder de “ligar ou desligar” o processo de angiogênese (“angiogenesis switch”)<sup>55</sup>

“*Angiogenic switch OFF*”: Quando as moléculas pró-angiogênicas estão em equilíbrio com as moléculas anti-angiogênicas

“*Angiogenic switch ON*”: Quando o balanço está compensado em favor da angiogênese.

Vários gatilhos podem acionar o início da angiogênese: metabólicos, mecânicos, mutações genéticas e reações imuno-inflamatórias.<sup>55</sup>

Folkman,<sup>60</sup> descreveu um fator responsável pela angiogênese, o qual chamou de fator angiogênico. Após a compreensão sobre a necessidade da angiogênese para a progressão tumoral, tornou-se muito atraente a possibilidade de se criar uma substância com função bloqueadora deste fator angiogênico como forma de tratamento dos tumores malignos. O tumor não seria erradicado, mas teria uma regressão sustentada enquanto o bloqueio angiogênico fosse mantido.<sup>61</sup>

Shing, Folkman e cols.<sup>62</sup> identificaram em 1984 o fator básico de crescimento do fibroblasto (FGF) em amostras de condrossarcoma, sendo o primeiro agente angiogênico descrito. Em modelos experimentais nos quais se empregou o FGF houve crescimento dos capilares sanguíneos, sendo que o FGF é hoje aceito como um fator pró-angiogênese. Foi com a descoberta de um novo agente associado à permeabilidade vascular e à angiogênese, inicialmente chamado de fator de permeabilidade vascular e, posteriormente, de fator de crescimento do endotélio vascular (“*vascular endothelial growth factor-VEGF*”), que se obteve uma substância com representatividade clínica significativa para uso terapêutico.

O VEGF é possivelmente o mais potente agente angiogênico conhecido,<sup>63</sup> havendo aumento da permeabilidade vascular em sua presença e constituindo importante estímulo para a mitose das células endoteliais. Em situações de hipóxia, é possível observar um aumento significativo dos níveis do RNAm para VEGF, bem como da proteína resultante.<sup>53,63,64</sup> Outros agentes biológicos parecem interferir na produção de VEGF: as interleucinas 1, 6 e 8; o fator de crescimento derivado de plaquetas; o fator de crescimento do hepatócito; o fator beta de crescimento de fibroblastos; e os fatores de crescimento transformadores (TGFs – “*transforming growth factors*”).<sup>64</sup>

A angiogênese pode ser quantificada pela contagem dos vasos sanguíneos em tumores excisados, conforme descrito por Weidner e cols.<sup>53</sup> A vascularização tumoral, segundo este autor, é quantificada através da aplicação de método imunistoquímico para antígenos presentes em células endoteliais como o CD31, CD34 e o fator VIII (fator de von Willebrand). Os vasos corados pelo método são então contados com microscopia de grande aumento nas áreas de maior intensidade de vasos, sendo estas chamadas de “*hot-spots*”. Usando esta metodologia, Weidner e cols.<sup>53</sup> analisaram dados de 49 pacientes com carcinoma de mama

invasor e os resultados demonstraram que a contagem de microvasos foi significativamente maior no grupo de pacientes que desenvolveram doença metastática, seja sistêmica ou axilar, sugerindo que a densidade microvascular poderia ser um fator preditivo independente para desenvolvimento de metástases a partir de neoplasias malignas de mama. Os microvasos começaram então, a partir de Weidner, a ser quantificados por diferentes métodos, incluindo a contagem das estruturas por campo de visão (densidade microvascular - DMV), métodos de imagética e estimação estereológica.<sup>11,65,66</sup> Existem controvérsias sobre a melhor metodologia para avaliar a DMV, pois a contagem dos “*hot spots*” tem um caráter subjetivo, podendo existir variações entre os observadores. O uso da imagética com a captura digital das imagens e sua leitura no computador pode reduzir o caráter subjetivo da avaliação. Outro problema existente é o uso de diferentes anticorpos para a avaliação da angiogênese, ocasionando confusão entre os diversos autores.<sup>65</sup>

Existem vários estudos que relacionam a densidade microvascular (DMV) com inúmeros tumores de diversos sistemas, mostrando uma ampla variação quanto ao significado clínico deste parâmetro e sua importância prognóstica.

Alguns trabalhos foram realizados para avaliação da angiogênese em TW. Os estudos europeus tendem a empregar o protocolo da SIOP, que contempla quimioterapia neoadjuvante previamente ao tratamento cirúrgico. Dentre estes, um dos mais importantes foi o de Skoldenberg e cols.<sup>11</sup> que utilizaram quatro marcadores de células endoteliais (CD31, CD34, vWF - fator de von Willebrand e UEA-1/Ulex europaeus agglutinin-1 lecitin) e utilizaram três procedimentos diferentes (DMV no “*hot-spot*”, conforme descrição de Weidner e cols.<sup>53</sup> e avaliação estereológica no “*hot-spot*” e em toda a lâmina, conforme descrição de Gundersen e cols.<sup>66</sup>) para quantificação da angiogênese tumoral em 33 pacientes. As lâminas foram avaliadas, sendo que os marcadores mais sensíveis foram o CD34 com 99% e o CD31 com 96%, enquanto a sensibilidade no vWF foi de 70% e UEA-1 de 71%. Foram avaliadas também as concentrações dos fatores de crescimento angiogênico, como o VEGF, TNF $\alpha$ , b-FGF, TGF $\alpha$ , HGF e angiogenina no soro de 14 pacientes, comparando-os com controles. A angiogenina estava levemente elevada, mas o VEGF e HGF estavam aumentados em três vezes. O b-FGF não estava elevado neste estudo, mas em um estudo<sup>67</sup> onde a medição do mesmo foi na urina encontrava-se elevado e podia ser correlacionado com o estadiamento e o



risco de recidiva, acreditando-se que este fator fique mais concentrado na urina do que no soro.<sup>11</sup> Os autores avaliaram a angiogênese em 33 pacientes com tumor de Wilms tratados de acordo com o protocolo da SIOP9, com quimioterapia neoadjuvante, e encontraram que a densidade microvascular aumentada estava correlacionada com maior mortalidade.

Ghanen e cols.<sup>68</sup> avaliaram a expressão do VEGF, de seu receptor Flt-1 e a DMV através de imunistoquímica em 62 pacientes com TW, os quais haviam sido tratados com quimioterapia pré-operatória. Eles encontraram 52% de expressão do VEGF e 47% do Flt-1 nas células do blastema, e mostraram que a expressão de VEGF e Flt-1 em células do blastema está correlacionada com pior prognóstico. A correlação significativa entre DMV e VEGF vista neste estudo sugere que o VEGF seja uma das moléculas responsáveis pela neoangiogênese em TW.<sup>68</sup>

Os estudos norte-americanos tendem a seguir os protocolos da NWTS, nos quais a cirurgia é a primeira etapa da terapêutica na maioria das situações clínicas. Dentre estes, Abramson e cols.<sup>4</sup> avaliaram a relação entre DMV e recidiva em TW e mostraram que a menor DMV foi relacionada a maior sobrevida em pacientes portadores de TW, sendo que Kayton e col<sup>69</sup> realizaram uma pesquisa em ratos mostrando que o VEGF foi encontrado em quantidades aumentadas com o crescimento do tumor e que havia uma relação estatisticamente significativa entre a síntese de VEGF e o desenvolvimento de metástases.

Rowe e cols.<sup>70</sup> avaliaram a arquitetura vascular do TW em ratos. Eles introduziram o TW humano nos rins direitos dos ratos e após 4,5 semanas avaliaram a diferença entre os rins com tumores inoculados e os rins normais à esquerda. A angiografia tumoral demonstrou um padrão vascular diferente marcado por vasos ordenados ao acaso e de tamanhos irregulares nos rins inoculados com tumor. Esta arquitetura vascular já havia sido descrita em doenças da retina nas quais os vasos eram direcionados pela liberação do VEGF, sugerindo que a neoangiogênese em TW também é guiada por VEGF.

Rowe e cols.<sup>71</sup> e Kim e cols.<sup>10</sup> avaliaram o uso do anticorpo anti-VEGF num modelo experimental em ratos e encontraram supressão do crescimento do tumor primário e das metástases em TW anaplásico, havendo diminuição da rede vascular em ratos durante o estímulo antiangiogênico.

Huang e cols.<sup>72</sup> concluíram que a terapia com anti-VEGF 165 foi efetiva em tumores de Wilms experimentais inoculados em ratos, sem apresentar efeitos adversos. Esta terapêutica altamente específica onde a apoptose ocorreu apenas na neovascularização, mas não nas células normais pode ser importante num futuro próximo.

Huang e cols.<sup>9</sup> sugeriram que a disfunção do gene supressor tumoral *p53* pode contribuir para o crescimento dos TW, principalmente aqueles de histologia favorável e que são clinicamente agressivos. Tal disfunção estaria relacionada com a aceleração da neovascularização pela depleção do inibidor da angiogênese, denominado trombospondina-1 e pela super-regulação da expressão do VEGF.

Karth e cols.<sup>73</sup> avaliaram a expressão do VEGF e de um importante fator responsável pela regulação do VEGF que é o fator indutor de hipóxia alfa-1 (HIF-1 $\alpha$ ) em espécimes de TW, por imunistoquímica e concluíram que ambos são expressos simultaneamente, chegando a conclusão de que a hipóxia intratumoral estimula a produção de VEGF.

A literatura em relação à angiogênese em outros tumores é extensa, uma vez que o estudo da angiogênese tumoral tem sido aplicado em praticamente todos os tumores nos diversos órgãos.

Chung e cols.<sup>50</sup> estudaram o valor prognóstico da angiogênese em tumores do trato gastrointestinal e concluíram que a DMV e a expressão de VEGF podem ser bons indicadores prognósticos e de recidiva em pacientes com câncer gástrico e colo-retal.

Nakagawa e cols.<sup>74</sup>, analisando dados de 103 esofagectomias por carcinoma epidermóide do esôfago, observaram que a DMV guardava relação com a profundidade da penetração do tumor na parede do órgão, ocorrência de metástases intra-murais, índices elevados de recorrência pós-operatória e pior sobrevida geral.

Du e cols.<sup>75</sup> observaram que 81% dos carcinomas de esôfago e que 67,5% dos adenocarcinomas de estômago expressavam VEGF, resultando em índices aumentados de DMV, sendo maior nas lesões malignas do que em patologias benignas. Na avaliação destes

autores, a DMV foi significativamente maior em tumores avançados quando comparados a lesões precoces.

Tsujitani e cols.<sup>76</sup> encontraram relação entre a DMV, o tamanho dos tumores e a presença de metástases linfáticas em adenocarcinomas de estômago, sendo que a DMV foi maior nos tumores que também expressavam o VEGF. Estes autores consideraram a DMV como um fator preditivo independente do prognóstico.

Tarta<sup>77</sup> observou que a proliferação vascular acompanha o desenvolvimento dos tumores colo-retais, com números progressivamente maiores de microvasos em adenomas de baixo grau, alto grau e adenocarcinomas precoces.

Saclarides e cols.<sup>78</sup> relataram que a DMV aumentada foi relacionada à estágios anátomo-patológicos mais avançados, maior tamanho dos tumores e maior recorrência metastática em portadores de adenocarcinoma do reto.

Tanigawa e cols.<sup>79</sup>, em 133 casos de câncer colo-retal, observaram que a contagem microvascular foi significativamente maior no grupo de pacientes que foram a óbito em decorrência de recidiva da neoplasia quando comparados com os indivíduos livres de doença. A DMV elevada apresentou correlação estatisticamente significativa com a ocorrência de metástases por via hematogênica, tumores pouco diferenciados e maior profundidade de penetração na parede intestinal pela lesão.

Yao e cols.<sup>80</sup> observaram que 90,9% dos casos metastáticos de hepatocarcinomas expressavam VEGF, contra 63,9% das lesões localizadas e a DMV acompanhou a taxa de expressão do VEGF, sendo ambas maiores nas lesões não encapsuladas, pouco diferenciadas e que apresentavam metástases. Tanto a DMV quanto os índices de expressão do VEGF se correlacionaram com a intensidade de invasão vascular e com a disseminação sistêmica em tumores primários de fígado.

Em neoplasias ginecológicas, Nayha e cols.<sup>81</sup> avaliaram a intensidade da neovascularização em endométrios normais, hiperplásicos e no adenocarcinoma. Os autores observaram que alterações na DMV se correlacionavam com estágios progressivamente mais

graves da doença endometrial, com DMV inferior em endométrios proliferativos e hiperplasias simples, e mais elevada em hiperplasias com atipias significativas e adenocarcinomas.

Nos tumores cervicais uterinos, Cantu de Leon e cols.<sup>82</sup> avaliando 118 pacientes portadores de carcinomas, encontraram correlação entre DMV elevada e recorrência tumoral nos casos identificados como estágio II e em pacientes com idade inferior a 40 anos. Em lesões de estágio clínico mais avançado, entretanto, os autores não encontraram relação entre a DMV e o prognóstico.

Mas existem trabalhos controversos, Banner e cols.<sup>83</sup>, estudando 22 pacientes com carcinomas do cólon e reto com invasão trans-mural da parede intestinal e sem metástases linfáticas, relataram que os pacientes com sobrevida mais longa apresentavam índices de DMV maiores quando comparados aos casos de recorrência precoce da neoplasia, sendo que Lindmark<sup>84</sup> já havia observado resultados semelhantes dois anos antes. Sua série de 227 pacientes com adenocarcinoma colo-retal demonstrou uma maior sobrevida nos casos com DMV elevada, sendo que não se observou relação entre a contagem dos vasos sanguíneos tumorais e o grau de diferenciação celular dos tumores ou o estágio clínico da doença.

Cianchi e cols.<sup>85</sup> relataram também uma associação entre DMV elevada e melhor comportamento clínico de tumores do reto sem metástases para a cadeia linfática regional. Os autores observaram ainda que contagens elevadas de vasos sanguíneos tumorais eram acompanhadas de um aumento na infiltração linfocitária das lesões, o que poderia indicar uma melhor resposta imune celular, a qual se correlacionaria com um melhor prognóstico. Estes mesmos linfócitos seriam os responsáveis pelo estímulo angiogênico aumentado através da liberação de agentes pró-angiogênicos.

Abdalla e cols.<sup>86</sup> descreveram uma série de pacientes tratados por adenocarcinoma do cólon e reto em que a DMV mais elevada foi associada com melhor prognóstico e sobrevida. Estes autores também descrevem a importância da reação inflamatória tumoral como agente estimulante da produção de vasos sanguíneos, devendo-se levar em consideração outros fatores como expressão de oncogenes, composição da matriz extracelular, moléculas de adesão intercelular, fatores de crescimento tumoral e grau de apoptose, que poderiam interferir na interpretação dos resultados.

Boxer e cols.<sup>87</sup>, da mesma maneira, observaram um pior prognóstico nos pacientes com índices de DMV baixos em casos de carcinoma colo-retal sem invasão linfática. Estes mesmos autores descreveram que a expressão do VEGF na extremidade invasora da lesão maligna guardava importante relação com a recorrência tumoral sistêmica, mesmo com contagens microvasculares reduzidas nesta mesma região. A deficiência de vascularização dos tumores nas margens invasoras que conduziria a hipóxia, um importante estímulo à produção do VEGF, poderia explicar estes achados. Tal fato teria importância clínica significativa uma vez que justificaria o uso de agentes anti-angiogênicos bloqueadores de VEGF mesmo em casos com contagens vasculares tumorais reduzidas.

Tan e cols.<sup>88</sup> demonstraram que tumores neuroendócrinos não apresentavam comportamento desfavorável mesmo com contagem elevada de microvasos, mas observou um melhor prognóstico para adenocarcinomas do pâncreas que se mostravam hipovascularizados.

Brieger e cols.<sup>89</sup>, estudando neurinomas de nervo acústico, observaram que, nos 34 casos avaliados, a contagem microvascular não se correlacionava com o tamanho dos tumores, a duração dos sintomas ou a idade dos pacientes.

Sonmezer e cols.<sup>90</sup>, não encontraram correlação entre a DMV, a sobrevida ou parâmetros anátomo-patológicos em neoplasias de ovário. Os níveis de VEGF também não mostraram importância significativa, ocorrendo correlação estatística somente com o volume de ascite. Não se observou também relação entre a intensidade de marcação imunoistoquímica para VEGF e a DMV nestes tumores.

### 2.3 Fator Tecidual

O FT é uma glicoproteína trans-membrana formada por 263 aminoácidos e que em sua forma madura, apresenta 219 aminoácidos em sua porção extracelular, 23 aminoácidos na cadeia trans-membrana e 21 na sua porção citoplasmática. Têm sido descritas duas formas de FT, a livre (solúvel no plasma) ou ligada à membrana celular (como as produzidas por macrófagos e células endoteliais) e à vesícula lipídica (como as encontradas na urina ou no sêmen). O FT apresenta funções no processo da via extrínseca da coagulação sangüínea ao combinar-se com o fator VII, resultando na ativação dos fatores IX e X e desencadeando as reações que terminam por converter fibrinogênio em fibrina, levando à formação final de um coágulo sangüíneo.<sup>91,92,93</sup> Ele é classificado como um membro da família dos receptores de fatores de crescimento hematopoiético que também incluem os receptores do interferon alfa e da interleucina 10.<sup>91</sup> Estudos datados do final do século XIX demonstraram que o mecanismo de coagulação sangüínea resulta da interação entre protrombina, cálcio, fibrinogênio e um quarto fator conhecido como tromboplastina ou fator tecidual.<sup>91</sup>

A expressão do FT foi identificada em diversas células de tecidos embrionários como epitélios, células do endoderma visceral, cardiomiócitos, músculo liso vascular e tecido neural, especialmente durante períodos de desenvolvimento embrionário nos quais os fatores de coagulação não estão presentes ou são incapazes de cruzar a barreira placentária.<sup>91</sup> Mais recentemente, estudos com inativação de genes em camundongos para não expressarem o FT revelaram que a deficiência do FT é letal para os embriões em função de um desenvolvimento incompleto da camada sub-endotelial dos vasos sangüíneos.<sup>12,91,94</sup>

O FT é expresso em vários tecidos, em pequenas quantidades, entretanto está presente em concentrações maiores na adventícia dos vasos e nos tecidos que circundam a maioria dos órgãos internos, funcionando como uma barreira hemostática. O aumento de atividade do FT também foi associado a citocinas inflamatórias (como o fator de necrose tumoral), mitógenos (como o VEGF, FGF e insulina), hormônios, endotoxinas, hipóxia e trauma mecânico. Normalmente o FT está presente nos fibroblastos da adventícia de vasos sangüíneos, cápsulas de órgãos, células epiteliais de pele e mucosas, células do estroma endometrial e astrócitos no

sistema nervoso central, mas não foi detectada sua presença em células intravasculares, como o endotélio normal, sugerindo que ele constitui um envelope hemostático no caso de ruptura da integridade vascular ou tecidual. Em células epiteliais e em fibroblastos, o FT se comporta como um gene de resposta imediata cuja indução por mitógenos não requer síntese protéica *de novo*, sugerindo que o FT possa estar envolvido na regulação da proliferação celular.<sup>91</sup>

Acredita-se também que o FT apresente efeitos morfogênicos sobre células de músculo liso e na placa aterosclerótica, onde os macrófagos e a muscular do vaso expressam o FT<sup>91</sup>.

Toschi e cols.<sup>95</sup> demonstraram que o FT está presente nas placas ateroscleróticas ricas em lipídios e sugeriram que ele representa um forte estímulo trombogênico sobre estas lesões, principalmente após a ruptura espontânea da placa. Por outro lado, após lesão mecânica arterial, como na angioplastia ou dilatação com balão, ocorre migração de células de músculo liso que participam da reparação do trauma. Este efeito benéfico, mediado em parte pelo FT, representa uma contrapartida vantajosa ao risco de trombose associada à exposição do FT. De fato, estudos demonstraram que a neutralização do complexo FT/Fator VII ativado (FT/FVIIa) resulta em diminuição da espessura da íntima arterial.<sup>96</sup>

Armand Trousseau,<sup>97</sup> descreve a chamada “síndrome de Trousseau”, onde observou que pacientes que se apresentavam com trombo-embolismo sintomático freqüentemente eram também portadores de uma neoplasia maligna oculta, como notou que indivíduos portadores de um tumor maligno apresentavam uma tendência aumentada para a trombose. Pesquisas mais recentes mostraram que esta observação é bastante precisa. Em pacientes com neoplasia de mama, a incidência de trombose e embolia é de 0,1% no estágio clínico I, chegando a 18% nos estágios III e IV.<sup>98</sup> De modo inverso, indivíduos com trombo-embolismo sem uma condição clínica que o justifique apresentam um risco significativamente aumentado, em até nove vezes, de terem uma neoplasia maligna nos seis meses a um ano subsequentes.<sup>99</sup>

Além destas funções reconhecidas, o FT pode apresentar outras funções não relacionadas à coagulação sanguínea. Sua expressão se encontra aumentada em vários tipos celulares tumorais que apresentam atividade pró-coagulante. Atualmente, o FT também foi relacionado ao desenvolvimento de metástases através de mecanismos de sinalização intracelular, bem como através da atividade proteolítica do complexo FT/Fator VII ativado.<sup>91,97</sup>

A associação entre a expressão do FT e TW é o foco central de nossa pesquisa.

### **2.3.1 Fator Tecidual e Angiogênese**

A expressão do FT por células endoteliais vasculares em tumores sugere uma relação entre a regulação da angiogênese e o sistema hemostático, sendo reconhecido há muito tempo que o FT é um dos agentes associados aos estados de hipercoagulabilidade relacionados aos tumores malignos.<sup>97,99</sup> Estudos experimentais mostraram a possibilidade que sua expressão aumentada demonstre uma aceleração do crescimento tumoral através da regulação da angiogênese. Em células de sarcoma, o crescimento tumoral e a angiogênese foram promovidas por “super-expressão” do FT e inibidas por supressão da expressão do FT. O tratamento com coumarínicos neste experimento não afetou o crescimento tumoral, demonstrando que o efeito do FT parece ser independente de seu papel na cascata da coagulação.<sup>100</sup> Fischer e cols.<sup>101</sup> relacionaram o aumento das metástases de melanoma com a função pró-coagulante do FT.

O estímulo angiogênico do FT é explicado por duas vias fisiológicas.<sup>97</sup> Uma delas é dependente do mecanismo de coagulação e a outra não. A rota angiogênica dependente da coagulação resulta da ligação do FT ao fator de coagulação VII, ativando a trombina. A presença de trombina resulta em lise dos fibrinopeptídeos A e B a partir da molécula do fibrinogênio, convertendo-o em fibrina. Além disto, a presença de trombina ativa as plaquetas, que se unirão à fibrina formando o coágulo. As plaquetas ativadas liberam fatores pró-angiogênicos, dentre eles o VEGF, que contribuem para a migração e a proliferação de células endoteliais. O VEGF, por sua vez, induz um aumento de permeabilidade vascular que determina um escape de proteínas plasmáticas, especialmente fibrina, as quais irão formar uma matriz ao redor das células tumorais. Esta matriz serve como base para migração de células endoteliais e para a angiogênese justa-tumoral. Por fim, a degradação da matriz de fibrina libera novos agentes estimulantes da proliferação vascular, o que contribui para a manutenção e para o incremento do estímulo angiogênico.<sup>97,102,103</sup> Um mecanismo não diretamente relacionado à cascata da coagulação, mas ainda assim envolvendo a expressão do FT por células tumorais representa uma fonte de estímulo angiogênico para as neoplasias<sup>97</sup>. A



fosforilação da porção citoplasmática do FT induz a formação de uma seqüência de sinais intracelulares que resultam na transcrição de vários genes. O VEGF tem sua transcrição aumentada pela ativação do FT, levando a um potente estímulo angiogênico,<sup>97,103,104</sup> ao contrário da trombospondina que é inibida pelo FT, reduzindo a sua capacidade anti-angiogênica. O aumento da atividade do VEGF, como descrito anteriormente, por ação do FT resulta na permeabilidade vascular exagerada com deposição de fibrina junto às células tumorais formando a matriz que será um estímulo à proliferação de vasos sanguíneos, pois apresenta altas concentrações de agentes pró-angiogênicos como o FGF, o próprio VEGF e o fator de crescimento associado à insulina tipo1 (IGF-1)<sup>97</sup>. Da mesma forma, o extravasamento de proteínas plasmáticas aumenta o índice de ligação entre o fator VII e o FT. O fator VII ativado produz um aumento de cálcio intracelular que, por sua vez, estimula a fosforilação da porção intracitoplasmática do FT, completando um ciclo de retro-alimentação positiva através de um novo incremento na transcrição do VEGF.<sup>97</sup> Ainda não se conhece a real parcela de responsabilidade de cada um destes mecanismos na fisiopatologia do fator tecidual com relação ao desenvolvimento do câncer.

O VEGF é considerado, entre os fatores pró-angiogênicos conhecidos, como o principal iniciador da angiogênese e o FT apresenta capacidade de estimular a expressão genética do VEGF, estimulando a proliferação vascular, fundamental para o desenvolvimento do tumor e sua habilidade de produzir metástases.<sup>97,104,105</sup> A atividade pró-angiogênica do FT é confirmada pela associação entre o aumento de sua expressão e o aumento da DMV, demonstrada em vários estudos em neoplasias malignas.<sup>53,54,106</sup> A alteração na homeostase angiogênica requer um desequilíbrio no balanço entre os fatores estimuladores e inibidores da angiogênese, os quais mantém a proliferação de células endoteliais sob controle.<sup>97</sup> O FT parece interferir neste equilíbrio através de um estímulo à expressão do VEGF<sup>97,107</sup> e na supressão da trombospondina 1, um peptídeo anti-angiogênico.<sup>97</sup>

Além disto, tanto o FT quanto o VEGF têm expressão aumentada na hipóxia, fenômeno freqüentemente observado na neoplasia maligna. Amirkhosravi e cols.<sup>108</sup> avaliaram a importância da hipóxia pelo aumento da expressão do FT em tecidos tumorais. Cultivaram células de vários tipos de neoplasias em meios com baixa tensão de oxigênio e encontraram um aumento da atividade pró-coagulante bem como da expressão do FT. Ao injetarem estas

culturas em cobaias, notaram que as cobaias expostas à baixa tensão de oxigênio (O<sub>2</sub>) produziram mais trombocitopenia e metástases pulmonares do que células cultivadas com níveis normais de O<sub>2</sub>. Os autores concluíram, então, que a hipóxia aumenta a expressão do FT em neoplasias malignas, fato que estimula a adesão plaquetária, facilitando o desenvolvimento de metástases hematogênicas através de um mecanismo associado à atividade coagulante do FT, relacionado ao fator VII ativado.

Parece claro que a expressão do FT está associada com processos oncogênicos, pois metástases expressam o FT e a maioria das células não malignas não expressam. Adicionalmente, alguns estudos mostram que a expressão do FT está relacionada a um risco significativo de metástases hepáticas no carcinoma de cólon e é essencial para metástases pulmonares em um modelo experimental. O FT também se encontra super-regulado em células tumorais primárias e muitos tumores mostram um aumento da atividade pró-coagulante.

Rickles e cols.<sup>109</sup> inocularam células neoplásicas em ratos imunossuprimidos observando o desenvolvimento de tumores com alta densidade microvascular e encontraram uma forte correlação entre a expressão do FT e a síntese de VEGF. Ao se transferir uma seqüência codificante completa do FT em uma linhagem tumoral com baixa expressão de FT/VEGF, estas células se tornaram produtoras destes dois elementos. Por outro lado, quando se inoculava uma seqüência de FT com alterações na porção intracitoplasmática que impediam a fosforilação, o que se observava era uma intensa produção do fator tecidual, mas não do VEGF. Estes resultados sugeriam que a porção citoplasmática do FT é necessária para o estímulo à produção do VEGF. Tais achados se somam aos de Abe e col<sup>110</sup> que descreveram, através de metodologia semelhante, o comportamento de várias linhagens de melanoma em relação à expressão do FT e a angiogênese. Tumores com altas taxas de FT/VEGF quando inoculados em camundongos imunossuprimidos produziam lesões sólidas altamente vascularizadas, enquanto que melanomas com baixa expressão destes dois elementos produziam tumores relativamente avasculares.

Hembrough e cols.<sup>111</sup>, em uma tentativa de avaliar o papel da coagulação no crescimento de tumores, testaram, *in vivo*, inibidores específicos para o complexo FT-FVIIa e para o fator

X ativado (FXa). Estes autores demonstraram que dois inibidores do complexo FT/FVIIa conseguiram diminuir a progressão de lesões primárias e metastáticas em cobaias, mas o uso de inibidores específicos do FXa não demonstrou atividade anti-tumoral. Uma vez que o FXa constitui o elemento final da rota pró-coagulante do FT-FVIIa, estes dados sugerem que a ação proteolítica deste último promove a proliferação tumoral e a angiogênese por um outro mecanismo além daquele observado através da cascata de coagulação sangüínea. Zhang e cols.<sup>104</sup> descreveram mais recentemente resultados semelhantes aos descritos anteriormente, só que utilizando linhagens celulares de tumores gástricos.

Carvalho<sup>15</sup> e Abdulkhadir e cols.<sup>54</sup> demonstraram, em casos de adenocarcinoma de próstata, que a atividade do fator tecidual na membrana celular teve associação direta com níveis mais elevados de PSA. A aferição da DMV nestas lesões mostrou que os índices mais elevados foram observados nos casos positivos para FT, levando os autores a concluir que a sua expressão pode servir como um marcador da agressividade dos tumores prostáticos, assim como um indicador de angiogênese aumentada. Weidner<sup>112</sup> e Akashi e cols.<sup>113</sup> também encontraram correlação prognóstica na expressão do fator tecidual em neoplasias de próstata. Em casos de doença metastática, 75,3% dos tumores expressavam o FT, sendo que estes indivíduos apresentaram pior desempenho clínico no tratamento com supressão hormonal.

Contrino e cols.<sup>114</sup> relataram que a expressão do FT pode ser encontrada em carcinomas de mama, mas não em doença fibrocística mamária. Os autores concluíram que células tumorais podem ativar células endoteliais adjacentes à lesão e estimular a proliferação de vasos sangüíneos justa-tumorais através de um importante estímulo angiogênico mediado pelo fator tecidual. Vrana e cols.<sup>115</sup> avaliaram a expressão do fator tecidual em células do estroma peritumoral de neoplasias de mama e encontraram uma relação significativa entre a presença do FT e a progressão para o carcinoma invasor. Em lesões infiltrativas havia células positivas para o FT, sendo constituídas principalmente por macrófagos e miofibroblastos. Para os autores, estes dados indicaram que o recrutamento ou ativação de células positivas para FT é um evento precoce na progressão para um carcinoma localmente invasor.

Seto e cols.<sup>106</sup> avaliaram a expressão do fator tecidual em 67 pacientes com adenocarcinoma colo-retal, correlacionando-a com a ocorrência de metástases hepáticas. Os

autores observaram que neoplasias com altas taxas de atividade do fator tecidual apresentaram um risco significativamente maior de desenvolvimento de lesões no fígado, bem como um pior prognóstico após três anos de acompanhamento. Da mesma maneira, Nakasaki e cols.<sup>116</sup> avaliaram a expressão de FT em tumores malignos colo-retais e mostraram que o FT estava presente em 57% da amostra e a intensidade de sua expressão se correlacionou com a classificação de Dukes. Além disto, observou-se uma relação significativa entre a expressão do FT e a do VEGF, sugerindo que a expressão do FT se relaciona com o grau de progressão da doença avaliado pelos critérios de Dukes, sendo o VEGF um elemento significativo na determinação do prognóstico destes pacientes. Fillmann,<sup>17</sup> em sua tese, mostrou correlação entre o grau de expressão do FT e a angiogênese tumoral, com DMV significativamente mais elevada em lesões onde a atividade do FT é mais alta, mas não houve correlação com outros fatores prognósticos.

Nitori e cols.<sup>117</sup> avaliaram a frequência da expressão do FT no adenocarcinoma pancreático e a sua expressão aumentada, considerada como a presença de mais de 25% das células positivas para o FT, foi relacionada a uma maior extensão do tumor primário, à ocorrência de metástases linfonodais e a tumores pouco diferenciados. O FT se mostrou como uma variável prognóstica de valor independente para recorrência e óbito por este tipo de neoplasia. Kakkar e cols.<sup>118</sup> observaram que carcinomas ductais pancreáticos pouco diferenciados expressavam o FT e que não estava presente em tecidos pancreáticos não neoplásicos. Para Khorana e Fine<sup>119</sup>, a expressão freqüente do FT pelas células malignas pancreáticas representa a principal razão para ocorrência de fenômenos típicos de coagulopatia, como trombo-embolismo, trombose de veia porta, coagulação intravascular disseminada e trombose venosa profunda, que aparecem como complicadores em até 57% dos indivíduos afetados por este tipo de neoplasia.

Koomagi e cols.<sup>19</sup> estudaram a expressão do fator tecidual em 191 neoplasias malignas pulmonares do tipo não pequenas células, sendo que a expressão do FT se correlacionou com a intensidade da expressão do VEGF e com a DMV. A positividade das células tumorais para o FT foi também associada a um pior prognóstico, com redução significativa da sobrevida após o tratamento.

Poon e cols.<sup>120</sup>, estudando casos de carcinoma hepatocelular, avaliaram a relação entre a expressão do FT, a DMV e fatores prognósticos. A atividade do FT foi associada a uma maior densidade de vasos sanguíneos bem como a uma elevada presença de VEGF. Além disso, tumores positivos para FT demonstraram maior ocorrência de invasão venosa, estágios clínicos mais avançados e lesões não encapsuladas. De fato, o FT se mostrou como fator prognóstico negativo independente nestas lesões. Kaido e cols.<sup>121</sup>, encontraram importância prognóstica em relação ao FT em casos de carcinoma hepatocelular. Indivíduos com tumores que expressavam o FT apresentaram uma maior frequência de trombose neoplásica da veia porta, metástases intra-hepáticas, hipoalbuminemia, e invasão capsular. A sobrevida livre de doença foi significativamente maior em pacientes com lesões negativas para atividade do FT o que, nesta amostra, demonstrou que o mesmo é um fator prognóstico negativo independente.

Toneto,<sup>18</sup> em sua tese, demonstrou que ocorreu expressão do FT nas células tumorais dos pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico, mas não houve correlação entre o FT e a DMV e entre o FT e os fatores prognósticos conhecidos para o adenocarcinoma gástrico. Também não encontrou correlação entre o FT e a sobrevida dos pacientes.

Até novembro de 2007, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura relacionando a expressão do FT e o TW, sendo este o foco central de nossa pesquisa.

### 3 OBJETIVOS

1. Avaliar a importância de fatores prognósticos reconhecidos (idade, estadiamento e tipo histológico) para a recidiva e óbito de pacientes com TW;
2. Quantificar o grau de densidade microvascular em TW;
3. Descrever a expressão imunoistoquímica do FT em TW;
4. Correlacionar a expressão do FT com o grau de densidade microvascular em TW;
5. Correlacionar a DMV com fatores de prognóstico, recidiva tumoral e sobrevida em TW;
6. Correlacionar a expressão do FT com fatores de prognóstico, recidivas tumorais e sobrevida em TW.

## **4 PACIENTES E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento, População e Amostra**

O trabalho de pesquisa realizado foi um estudo de coorte histórico, com componentes contemporâneos, que incluiu pacientes submetidos a nefrectomias totais ou parciais realizadas no Hospital São Lucas da PUCRS e Hospital da Criança Conceição com diagnóstico de tumor de Wilms desde julho de 1993 a julho de 2003, com N=45 pacientes. Todos os pacientes foram operados e acompanhados independentemente de receberem tratamentos complementares, com seguimento até o óbito ou até o momento da análise dos dados (junho de 2007).

Para análise das principais variáveis (expressão do fator tecidual e densidade microvascular) foram utilizados os blocos fixados em formalina a 10% e embebidos em parafina dos pacientes arrolados no estudo e armazenados no laboratório de Patologia do HSL-PUCRS e Hospital da Criança Conceição. As lâminas foram cortadas e fixadas com hematoxilina e eosina para confirmação da histologia, sendo o material avaliado por um patologista e pela pesquisadora quanto à representatividade e presença do tumor. As informações referentes aos dados clínicos foram coletadas a partir do protocolo (anexo B), tendo sido criado um banco de dados para correlacionar os fatores prognósticos conhecidos (histologia, estadiamento, idade) e o desfecho final (recidiva, óbito) com a expressão do fator tecidual e o grau de angiogênese tumoral.

#### **4.1.1 Imunoistoquímica**

Foram realizados cortes com espessura de 3  $\mu$ m nas lâminas incluídas em parafina imediatamente subseqüentes à identificação do tumor de Wilms. Estas foram submetidas à recuperação antigênica em banho-maria por 30 minutos a 99°C, utilizando tampão Tris/EDTA, pH 9 (20mM Tris/0,65 mM EDTA). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com

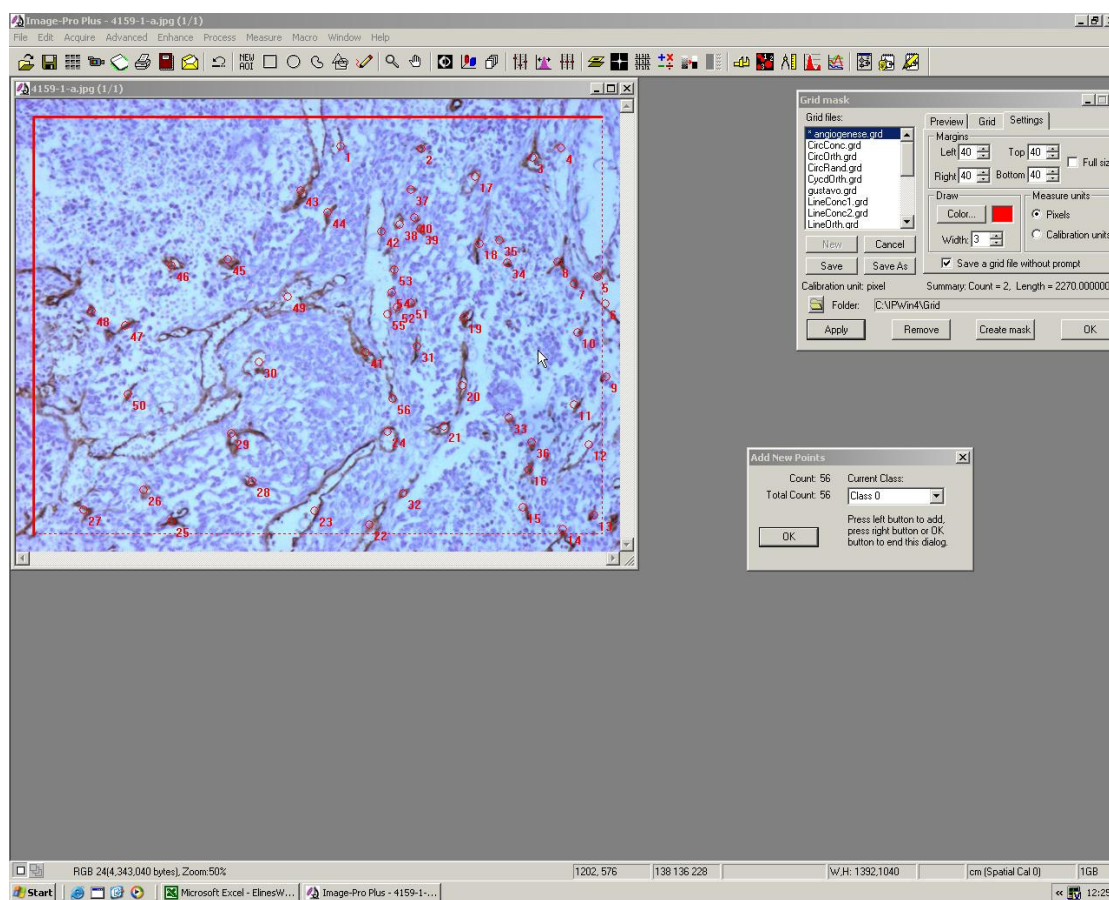
solução de peridrol a 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em álcool metílico) por 30 minutos. Os cortes foram imersos em solução salina a 5% em tampão PBS (“phosphate-binding saline”) por 30 minutos para diminuir a coloração de fundo (*background*). As secções foram então incubadas com anticorpo monoclonal de rato anti-Fator Tecidual humano tipo I (Mouse anti-human tissue factor, type 1 U.S. Biological – type Mab, IgG1 clone 2K1) com diluição de 1:30 e anticorpo monoclonal de rato anti-CD34 (CD34 classe II, Clone QBEnd 10 Dakocytomation) com diluição de 1:400. O sistema de detecção utilizado foi o kit Dako LSAB + peroxidase (Streptoavidina). Os cortes foram revelados utilizando-se cromógeno 3,3´diaminoazobenzidina (DAB) e tampão PBS em solução a 0,002% de peróxido de hidrogênio e contra-corados com hematoxilina, sendo desidratados, clarificados e montados com bálsamo e lamínula.

#### **4.1.2 Análise Digital das Imagens**

As lâminas foram analisadas sem o conhecimento prévio da evolução clínica dos pacientes e da classificação histopatológica anterior. Foi utilizado um sistema de análise digital composto por microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 (Oberkohen, Alemanha), com lentes neofluares, conectado através de uma vídeo-câmera Roper Scientific (Media Cybernetics , Silver Spring, EUA) a um microcomputador Pentium IV 2.2 GHz com 512 MB de memória RAM, disco rígido de 160 GB e placa de captura Image Pro Capture kit (Media Cybernetics , Silver Spring, EUA). Para a análise digital das imagens foi utilizado o programa Image Pro Plus versão 4.5, que permite a captura digital da imagem e após a inserção de grade de correção, marcação e contagem da área de interesse. Somente foram contados os microvasos incluídos completamente dentro da grade nas margens com traço contínuo e os que tocavam ou ultrapassavam a linha interrompida. (Figura 5) As imagens foram capturadas no formato TIFF (True Image Format File).

A captura das imagens foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS.





**Figura 5. Imagem do software de captura do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS.**

#### 4.2 Fatores de Exclusão

1. Inexistência de tumor viável no bloco de parafina que possibilitasse a realização dos estudos histológicos;
2. Pacientes sem acompanhamento adequado até o momento da análise.

### 4.3 Variáveis Principais

#### A. Variáveis preditoras:

1. Idade;
2. Histologia;
3. Estagiamento.
4. Expressão imunoistoquímica da angiogênese;
5. Expressão imunoistoquímica do FT;

#### B. Desfechos:

1. Recidiva tumoral (recorrência local e/ou metástases à distância);
2. Óbito.

#### 4.3.1 Idade

A idade dos pacientes foi tabulada em meses e anos. Para a análise estatística, considerou-se que três meses equivaleriam a 0,25, seis meses a 0,5 anos, e nove meses a 0,75 anos.

#### 4.3.2 Histologia

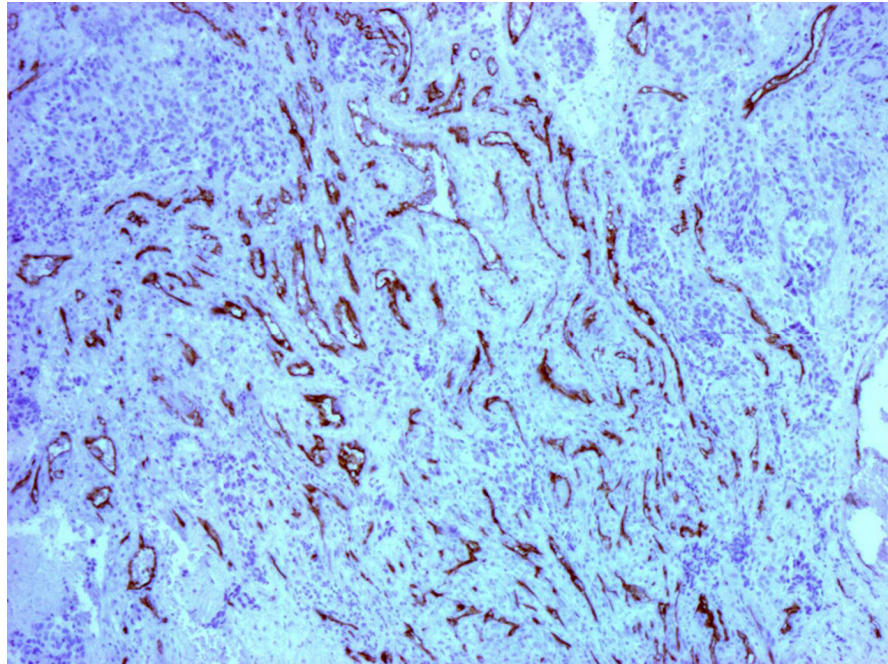
Os critérios de histologia utilizados na análise foram os propostos pelo “National Wilms Tumor Studies V” (NWTS-5): tumor favorável ou desfavorável, na dependência da presença de anaplasia focal ou difusa. A classificação por riscos da SIOP-9 (Tabela 2) foi realizada de forma retrospectiva para a correlação com a expressão do fator tecidual e com o grau de angiogênese tumoral.

### 4.3.3 Estadiamento

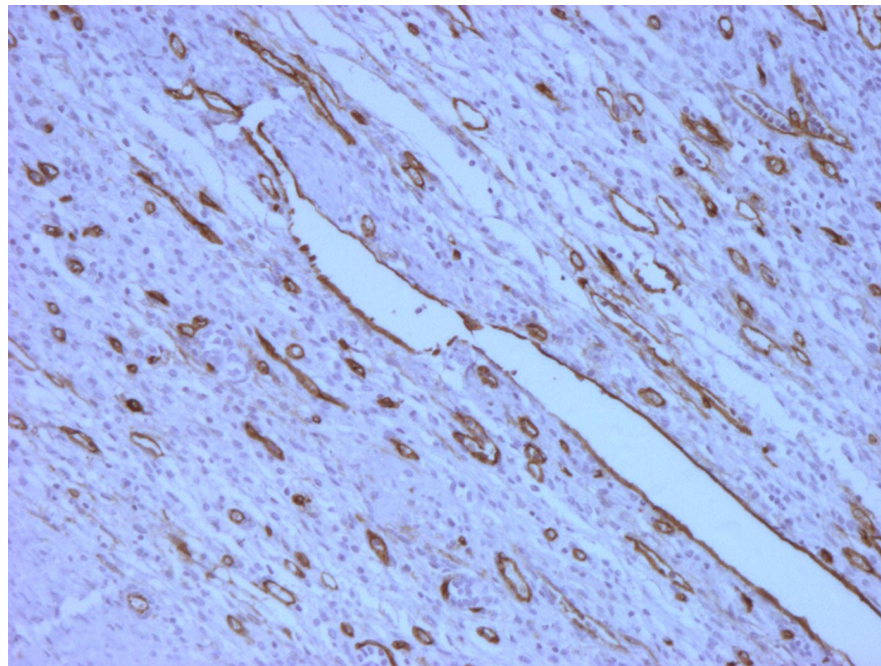
O estadiamento utilizado foi o da SIOP-9 nas diferentes categorias mostradas na Tabela 3, pois a maioria dos pacientes (n=34) foi submetida à ressecção cirúrgica após quimioterapia neo-adjuvante, conforme preconizado pela SIOP, sendo que apenas sete pacientes foram submetidas à ressecção primária do tumor sem quimioterapia neo-adjuvante. A abordagem cirúrgica do tumor foi determinada pelo cirurgião, independentemente do tamanho tumoral ou da gravidade da doença. Para efeito de análise, os pacientes com quimioterapia neo-adjuvante e os com cirurgia primária foram estudados quanto a fatores pré-operatórios (idade, sexo, estadiamento, histologia), demonstrando-se a equiparação dos mesmos quanto a estas variáveis.

### 4.3.4 Expressão imunoistoquímica da angiogênese

A contagem dos microvasos foi realizada em secções dos cortes nos blocos de parafina imediatamente adjacentes aos utilizados para a identificação da área tumoral e para a avaliação do fator tecidual. Foram realizados controles negativos em tecido renal não neoplásico, que não expressaram os antígenos em estudo e controles positivos em tecido de carcinoma prostático para confirmar a reatividade dos mesmos. A identificação da microvascularização foi feita através dos pontos mais vascularizados da lâmina (“*hot spots*”) encontradas com magnificação baixa (50x). Sempre que possível foram identificados três pontos de vascularização mais intensa. Após a sua identificação, foi realizada a captura da imagem em dez campos diferentes de cada “*hot spot*” com magnificação de 400x (1312x1040 pixels) correspondendo à área de 0,76 mm<sup>2</sup>. Após a contagem microvascular foi utilizada uma média aritmética das áreas identificadas para fins de análise estatística. Os vasos foram identificados pela coloração marrom, em contraste com o fundo azul claro do tumor.



**Figura 6. Expressão imunohistoquímica da angiogênese no tumor de Wilms (“hot spot”).  
Magnificação de 50x.**

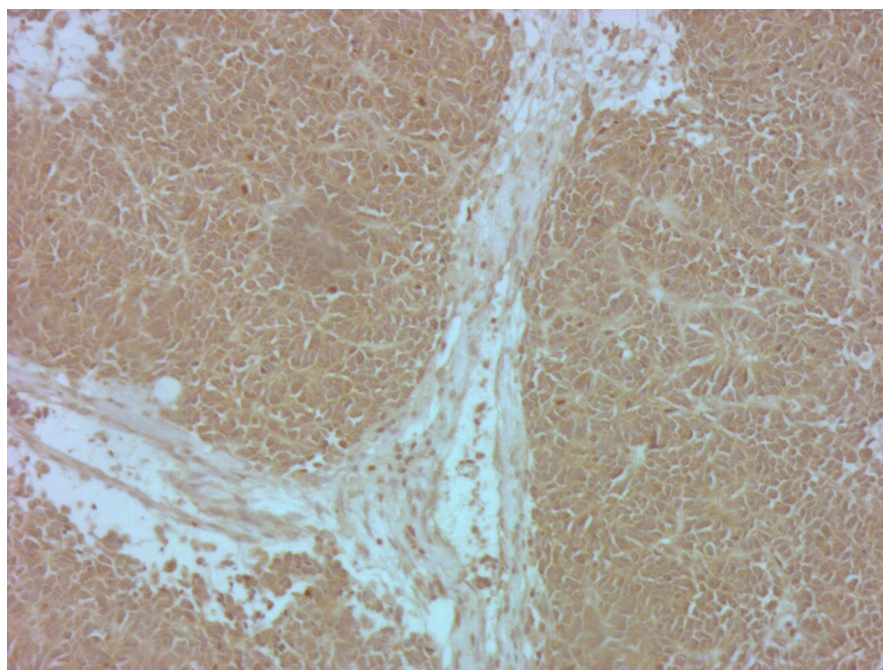


**Figura 7. Expressão imunohistoquímica da angiogênese no tumor de Wilms.  
Magnificação de 400x.**

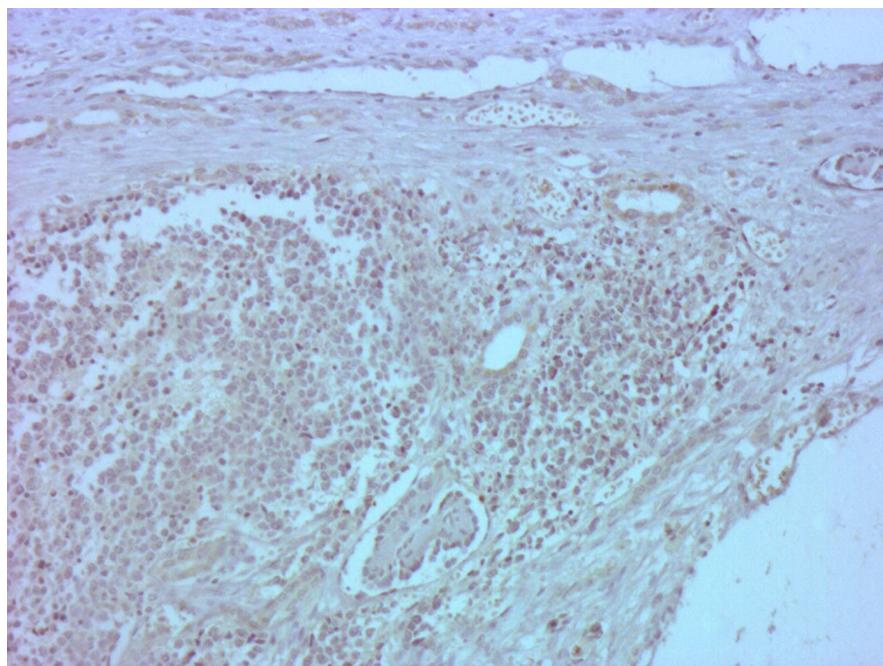


#### 4.3.5 Expressão imunoistoquímica do fator tecidual

A quantificação da expressão do FT foi avaliada através da reatividade para o anticorpo, utilizando-se para aferição uma lente objetiva com magnificação de 100x, sendo avaliada a superfície das células coradas em relação ao tecido examinado. Foram utilizados para controles negativos e positivos do anticorpo anti-FT amostras de tecido de neoplasias malignas da próstata, que sabidamente apresentam alta expressão imunoistoquímica de FT.<sup>15</sup> A expressão do FT foi classificada em quatro categorias: I (0 a 25% das células com tumor de Wilms coradas), II (26 a 50%), III (51 a 75%) e IV (76 a 100%). A expressão do FT foi avaliada globalmente no tumor, e ainda considerando-se as diferentes histologias do tumor independentemente (FT expresso no blastema, no estroma e epitélio). A expressão do FT foi aferida por dois observadores independentes, sendo uma a pesquisadora e outro o orientador.



**Figura 8. Expressão do fator tecidual no tumor de Wilms (Categoria IV).  
Observar o estroma pouco corado, enquanto mais do que 75% das células  
do blastema e do componente epitelial expressam FT.**



**Figura 9. Expressão do fator tecidual no tumor de Wilms (Categoria I). Menos do que 25% das células com tumor de Wilms expressam o FT.**

#### **4.3.6 Recidivas (recorrência local e/ou metástases à distância)**

As recorrências locais e a ocorrência de metástases à distância foram qualificadas como recidivas tumorais. As metástases foram discriminadas quanto a serem únicas ou múltiplas e foram computados os órgãos comprometidos.

#### **4.3.7 Óbitos**

Os pacientes foram acompanhados até o óbito ou até o momento da análise (Junho de 2007). A causa dos óbitos foi computada em todos os casos obtidos.

#### **4.4 Análise Estatística**

As variáveis quantitativas foram descritas por mediana e valores mínimo e máximo, enquanto que as categóricas por frequências e percentuais. Optou-se por utilizar as medianas

na análise dos dados, para reduzir o efeito de dispersão gerado por valores muito discrepantes da média (“outliers”) observados nas estatísticas descritivas de algumas das variáveis (p.ex., idade e número de vasos). A comparação dos dados quantitativos foi feita utilizando-se o teste não-paramétrico U de Wilcoxon-Mann-Whitney e nos dados categóricos usou-se o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou o teste exato de Fisher, quando necessário.

A avaliação dos desfechos que envolvem seguimento foi realizada por curvas de Kaplan-Meier, com a significância estatística determinada pelo teste de log rank. A avaliação do grau de correlação entre a densidade microvascular e a expressão do FT foi feita com o auxílio de gráficos de dispersão de pontos e gráficos de “boxplot” e cálculo do coeficiente de correlação de Spearman.

Para a consideração do efeito combinado de diversos fatores foi utilizada a regressão de azares proporcionais de Cox (regressão multivariável) com expressão da força de associação pelo “hazard ratio”, aqui denominado risco relativo com seu respectivo intervalo de confiança de 95%.

Os dados foram analisados com o auxílio do programa SPSS versão 12.0 para Windows. O nível de significância adotado foi de  $\alpha$  a 5% ( $P < 0,05$ ).

#### **4.5 Ética**

A pesquisa está em conformidade com as normas internas do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS e Hospital da Criança Conceição e com os itens III.3.i e III.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como a diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas envolvendo Seres Humanos (CIOMS 1993).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Protocolo n° 490/05 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição – Protocolo n° 157/06 (anexos C, D e E).

Como as análises imunoistoquímicas não terão influência no tratamento e evolução dos pacientes vivos, foi dispensado o Termo de Consentimento e preenchido o Termo de Compromisso para Utilização de Dados em Prontuários e de Bases de Dados em Projetos de Pesquisa (anexo A).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da Amostra

No período de julho de 1993 a julho de 2003, tratamos no Hospital São Lucas da PUCRS e no Hospital da Criança Conceição 45 crianças com diagnóstico de tumor de Wilms, sendo que 41 destas preencheram os critérios de inclusão deste trabalho. Vinte e três crianças eram do sexo feminino (56,1%) e 18 eram do sexo masculino (43,9%). Os tumores acometeram o rim esquerdo em 22 casos (53,7%), o rim direito em 17 casos (41,5%), e houve acometimento bilateral dos rins ao diagnóstico em dois casos (4,9%). Quatro crianças foram excluídas da análise, três delas pela impossibilidade da localização dos blocos de parafina para realização do estudo imunoistoquímico e uma delas pela transferência para tratamento quimioterápico na cidade de origem, o que ocasionou a perda do seguimento da mesma.

Dezoito 18 pacientes (43,9%) apresentaram recidivas (recorrência local da doença e/ou metástases à distância) durante o seguimento, sendo que 14 (34,1%) foram a óbito. O sítio de recidiva mais freqüente foi o pulmão, seguido pela recorrência local. Em 50% das recidivas (9 casos) as metástases foram múltiplas, sendo que o acometimento hepático (presente em 5 casos) só ocorreu neste cenário de metástases múltiplas. As metástases foram diagnosticadas em 11 casos durante o tratamento quimioterápico e/ou radioterápico e entre quatro meses e dois anos do término do tratamento em sete pacientes. Não houve recidiva após dois anos da conclusão do tratamento.

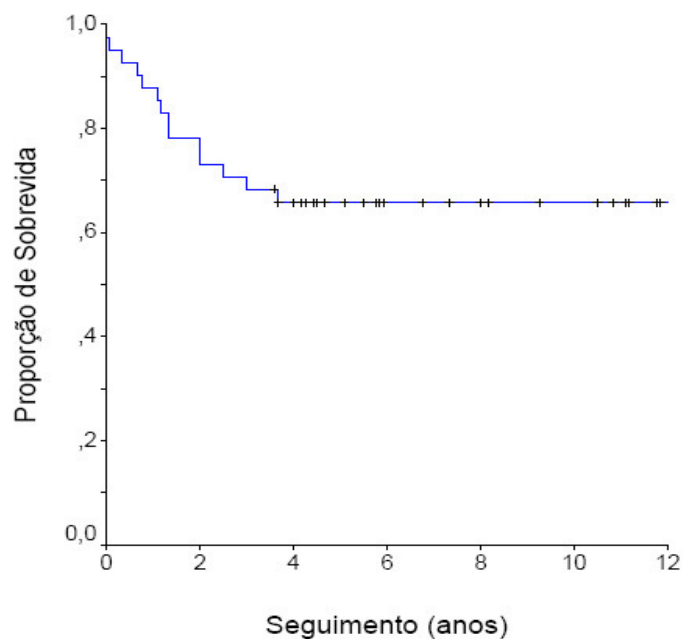
As principais características clínicas e anatomo-patológicas dos pacientes estão detalhadas na Tabela 5.

**Tabela 5. Características clínicas e anátomo-patológicas da amostra (N=41).**

<b>Mediana da idade</b>		<b>2,6 (0,33 a 7,25)</b>
<b>Sexo (Feminino:Masculino)</b>		<b>1,3 : 1</b>
<b>Localização</b>	Rim esquerdo	<b>22 (53,7%)</b>
	Rim direito	<b>17 (41,5%)</b>
	Bilateral	<b>2 (4,9%)</b>
<b>Diferenciação histológica</b>	Favorável	<b>38 (92,7%)</b>
	Desfavorável	<b>3 (7,3%)</b>
<b>Estadiamento (SIOP-9)</b>	I	<b>8 (19,5%)</b>
	II	<b>15 (36,6%)</b>
	III	<b>12 (29,3%)</b>
	IV	<b>4 (9,7%)</b>
	V	<b>2 (4,9%)</b>
<b>Recidivas tumorais</b>	Com recorrência	<b>18 (43,9%)</b>
	Pulmão	<b>6 (33,3%)</b>
	Recorrência local	<b>3 (16,7%)</b>
	Múltiplas	<b>9 (50,0%)</b>
<b>Sobrevida (histologia NWTS)</b>	Favorável	<b>27 (71,1%)</b>
	Desfavorável	<b>0 (0%)</b>

Os pacientes foram seguidos desde o diagnóstico até o momento da análise ou do óbito. Houve 14 óbitos relacionados à doença, sendo um deles decorrente de complicações cirúrgicas, mas que se encontrava no estágio III ao diagnóstico e o restante secundário à recidiva tumoral. O tempo mediano de acompanhamento dos pacientes foi de 4,4 anos, com um mínimo de zero anos e um máximo de 12 anos. A sobrevida ao final de dois anos foi de 78% e ao final de cinco anos foi de 66%, permanecendo inalterada ao final de 10 anos (66%).

A curva de sobrevida global dos pacientes está demonstrada na Figura 10.



**Figura 10. Curva de sobrevida geral dos pacientes.**

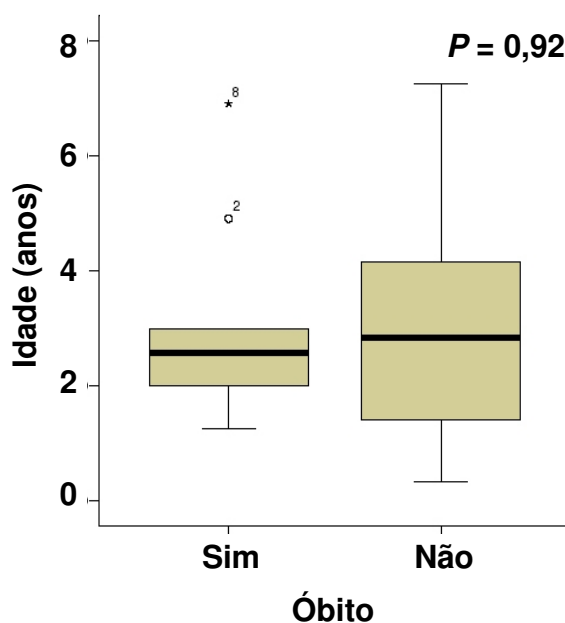
### 5.1.1. Idade

A mediana das idades ao diagnóstico foi de 2,58 anos, sendo a idade mínima de 0,33 anos (4 meses) e a máxima de 7,25 anos. A mediana das idades dos pacientes masculinos foi de 2,71 anos (mínimo de 0,50 anos e máximo de 4,91 anos) e dos femininos foi de 2,58 anos (mínimo de 0,33 anos e máximo de 7,25 anos) não havendo diferença estatisticamente significativa entre a idade e o gênero dos pacientes ( $P= 0,32$ ).

A mediana das idades entre o grupo de histologia favorável foi de 2,71 anos (mínimo de 0,33 anos e máximo de 7,25 anos) e o de histologia desfavorável foi de 2,50 anos (mínimo de 1,33 e máximo de 6,91 anos) com um  $P=0,87$ . Também não houve diferença estatisticamente significativa entre a idade dos pacientes e a inclusão nos grupos de risco estabelecidos pela SIOP-9; a mediana de idade entre os pacientes dos grupos de risco intermediário/baixo foi de 2,71 anos (mínima de 0,33 anos e máxima de 7,25 anos), enquanto que a mediana das idades

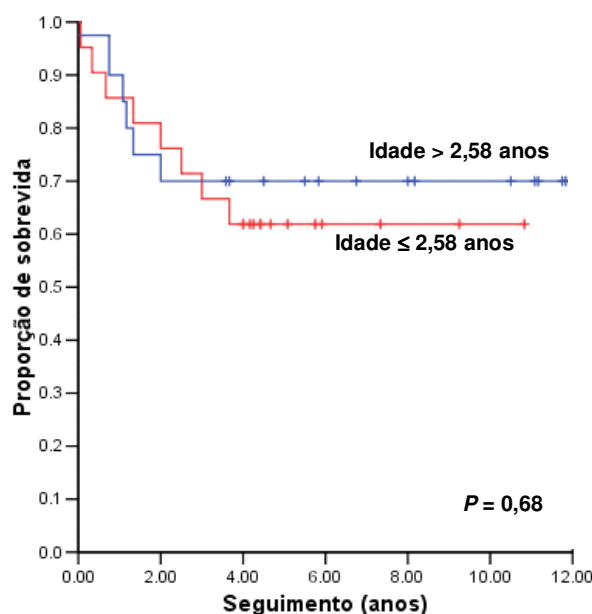
dos pacientes do grupo de alto risco foi de 2,58 anos (mínima de 0,67 anos e máxima de 6,91 anos) com  $P=0,63$ . A mediana das idades também não variou significativamente entre os diferentes estágios, sendo que nos estágios I+II a mediana das idades foi de 2,58 anos (mínimo de 0,33 anos e máximo de 7,25 anos) e nos estágios III+IV a mediana das idades foi de 2,91 anos (mínimo de 1,0 ano e máximo de 6,91 anos) com  $P=0,64$ .

Não houve diferença significativa entre as medianas das idades dos pacientes que apresentaram recidivas (mediana de 2,71 anos; sendo a idade mínima de 1,33 e a máxima de 7,25 anos) e dos que ficaram livres da doença (mediana de 2,58 anos; com a mínima de 0,33 e a idade máxima de 7,0 anos) com  $P=0,58$ . A idade dos pacientes ao diagnóstico não foi fator determinante do óbito; a mediana das idades dos 27 pacientes que sobreviveram foi de 2,83 anos (mínima de 0,33 e máxima de 7,25 anos) e a mediana das idades dos 14 pacientes que foram a óbito foi de 2,58 anos com a mínima de 1,33 e máxima de 6,91 anos e  $P=0,92$ .



**Figura 11. Gráfico de “boxplot” representando a diferença da idade (anos) entre os grupos que sobreviveram (n=27) e que foram ao óbito (n=14). O valor  $P$  representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.**

Quando comparamos a idade dos pacientes com a proporção de sobrevida dos mesmos vimos que não existe diferença significativa com  $P=0,68$ , conforme Figura 12.



**Figura 12. Curvas de sobrevida em relação à mediana das idades (2,58 anos).**

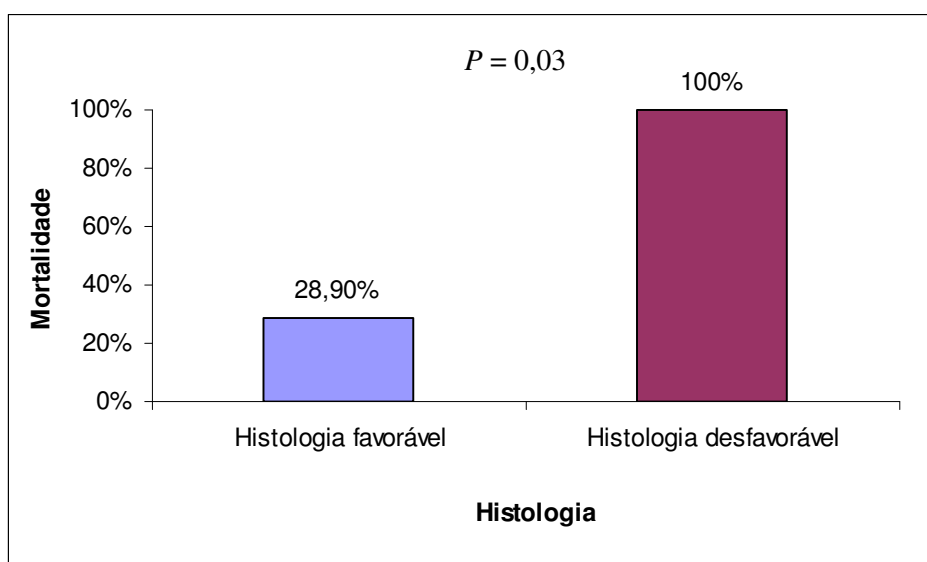
### 5.1.2 Histologia

Dentre os 41 tumores estudados, em 26 havia a coexistência dos três tipos histológicos característicos dos TW (componentes epitelial, estromal e blastematoso), conforme Figura 1. Em 14 casos havia a presença de somente dois tipos, sendo que um caso apresentava exclusivamente blastema. Considerando-se todas as possibilidades de associações, o tipo histológico predominante foi o estroma (presente em 40 pacientes), secundado pelo blastema (presente em 36 casos) e pelo componente epitelial (presente em 31 das lâminas). Na Tabela 6 correlacionamos a presença de determinado tipo histológico com a recidiva tumoral e óbito, sem encontrarmos significância estatística.

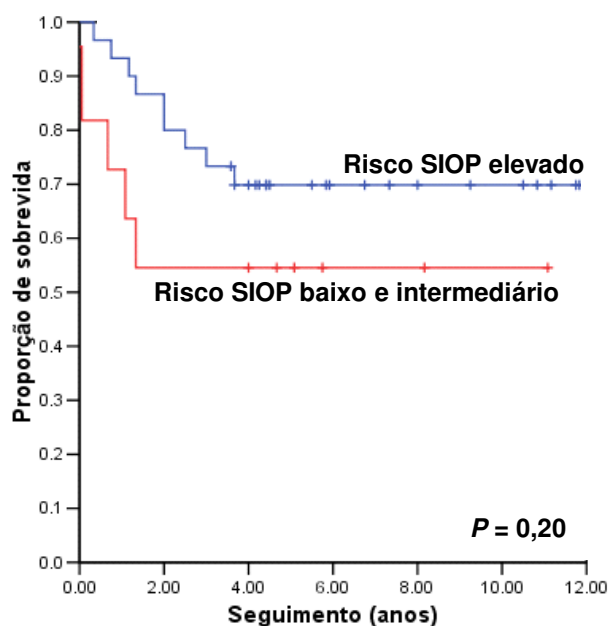
**Tabela 6. Correlação entre a presença de tipos histológicos e óbito / recidiva tumoral.**

Tipo Histológico Presente		Óbito	<i>P</i>	Recidiva	<i>P</i>
<b>Blastematoso (presença de)</b>	36	13 (36,1%)	0,65	16 (44,4%)	0,99
<b>Epitelial</b>	31	10 (32,3%)	0,71	14 (45,2%)	0,99
<b>Estromal</b>	40	13 (32,5%)	0,34	17 (42,5%)	0,44
<b>Misto (3 componentes)</b>	26	9 (34,6%)	0,99	12 (46,2%)	0,75

Considerando o grau de diferenciação histológica proposta pelo NTWS, os tumores com histologia favorável foram a grande maioria. Trinta e oito pacientes (92,7%) apresentaram histologia favorável e somente três (7,3%) apresentaram histologia desfavorável. Todos os pacientes com histologia desfavorável apresentaram recidiva tumoral, enquanto que esta ocorreu em apenas 39,5% dos pacientes com histologia favorável ( $P=0,08$ ). Esta classificação foi fator determinante de mortalidade; todos os pacientes com histologia desfavorável morreram, enquanto que apenas 28,9% dos pacientes com histologia favorável faleceram ( $P=0,03$ ).

**Figura 13. Comparação entre mortalidade e histologia favorável e desfavorável (NWTs).**

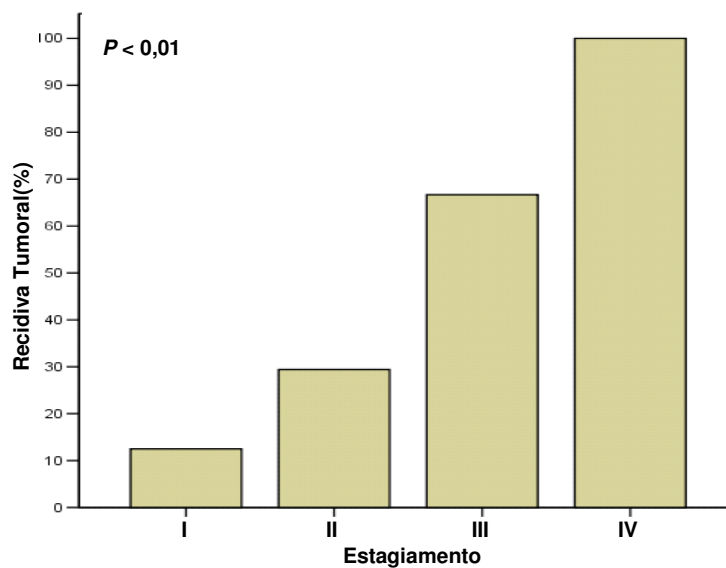
Considerando a classificação histológica proposta pela SIOP-9, 11 pacientes eram de alto risco e 30 pacientes eram de risco intermediário/baixo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a taxa de recidiva tumoral nos dois grupos  $P=0,49$ . A sobrevida também não foi significativamente diferente entre os dois grupos, conforme a Figura 14.



**Figura 14.** Curvas de sobrevida em relação à categoria de risco (SIOP-9)

### 5.1.3 Estadiamento

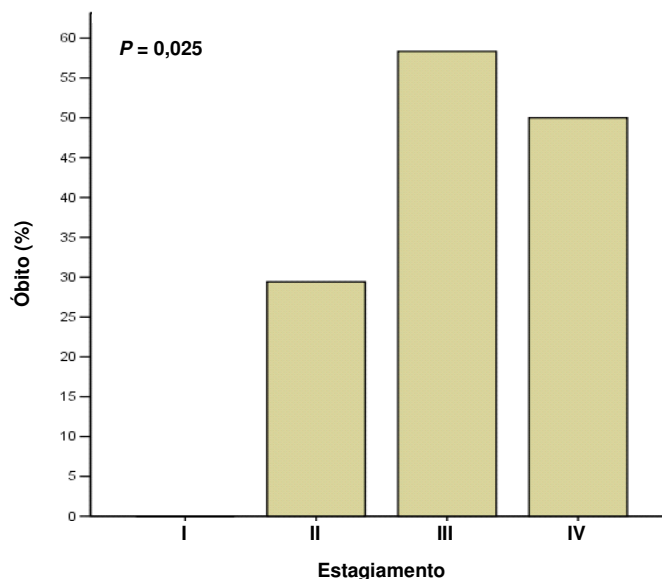
Quanto ao estadiamento foram considerados os estágios I a IV, sendo que os dois pacientes em estadiamento V (acometimento renal bilateral) foram reclassificados de acordo com a classificação do lado mais comprometido, como a SIOP recomenda. O estadiamento foi um determinante para a recidiva tumoral, sendo que dos 18 pacientes que apresentaram recidiva tumoral, 12 pacientes encontravam-se nos estágios III e IV (8 no estágio III e 4 no IV) ao diagnóstico e 6 encontravam-se nos estágios I e II (um no estágio I e 5 no II) ( $P=0,003$ ); Figura 15.



**Figura 15. Gráfico de barras representando o percentual da recidiva tumoral em cada um dos estágios.**

**O valor  $P$  representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.**

Com relação ao óbito, quanto mais avançado o estagiamento maior a probabilidade de morte, com 9 óbitos nos estágios III e IV (7 no estágio III e 2 no IV), 5 óbitos no estágio II e nenhum óbito no estágio I ( $P=0,02$ ).



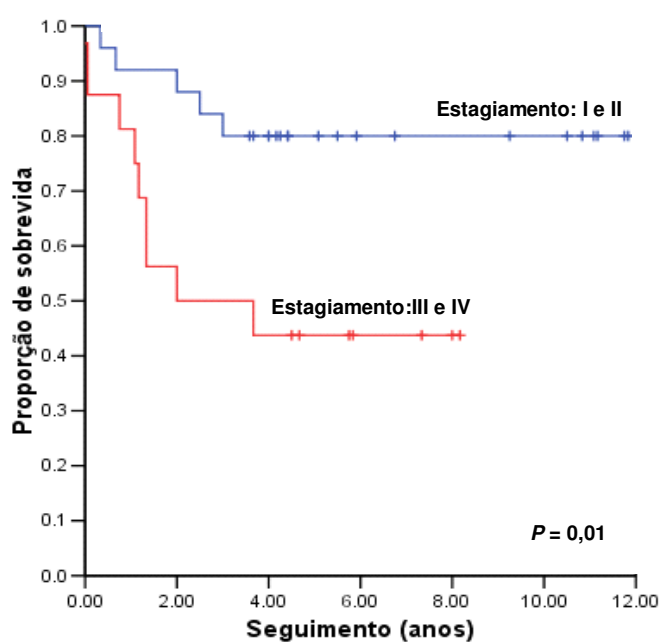
**Figura 16. Representação gráfica do percentual de óbitos em cada um dos estágios.**

**O valor  $P$  representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.**



Ao estudarmos a categoria de risco do paciente com o estagiamento não encontramos correlação ( $P=0,07$ ), assim como não houve correlação entre a categoria de risco e a expressão de FT ( $P=0,13$ ) e entre a categoria de risco e a DMV ( $P=0,40$ ).

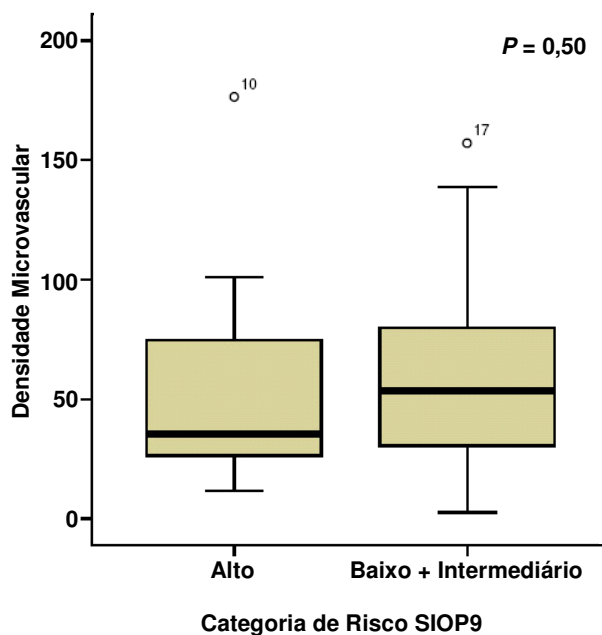
A sobrevida dos pacientes foi diretamente relacionada ao estágio da doença como representado na Figura 17.



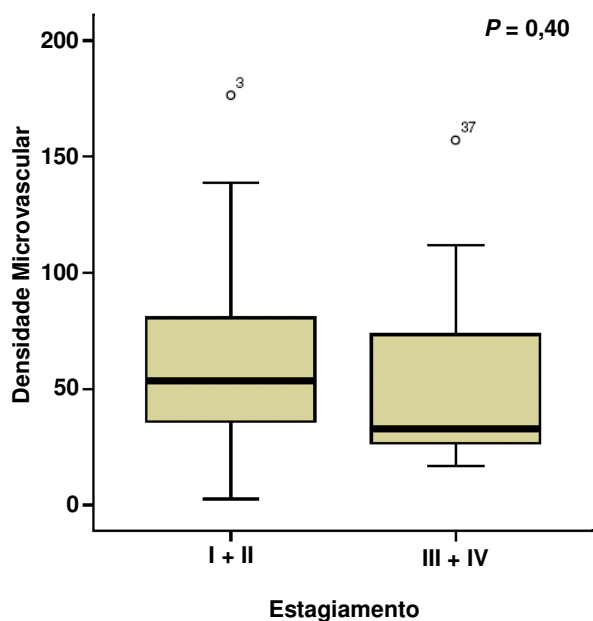
**Figura 17. Curvas de sobrevida por estadiamento da SIOP-9 do tumor de Wilms.**

## 5.2 Densidade Microvascular

O número de microvasos por campo variou de 3 até 176, sendo que a mediana foi de 47,5 microvasos por campo. Não houve correlação entre a DMV e a categoria de risco do paciente ( $P=0,5$ ) (Figura 18), bem como entre a DMV e o estadiamento ( $P=0,4$ ) (Figura 19).

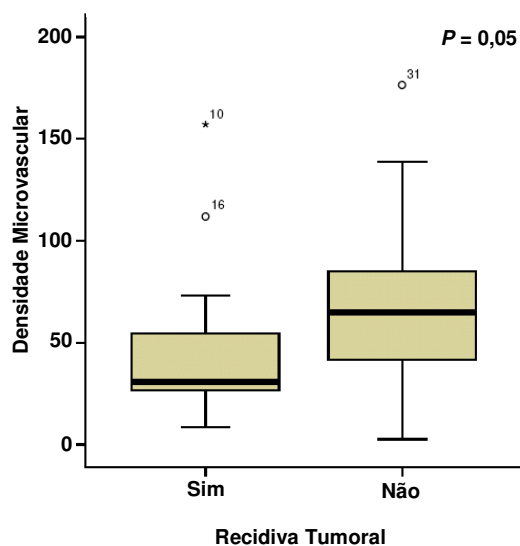


**Figura 18.** Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre a DMV nas categorias de risco da SIOP-9 (risco alto e intermediário/baixo). O valor  $P$  representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.



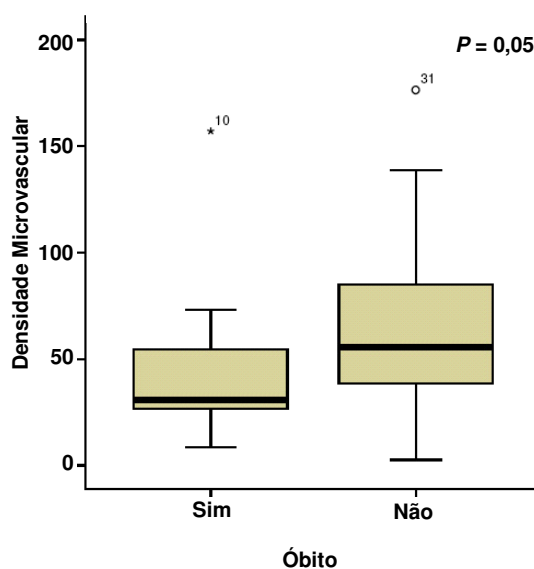
**Figura 19.** Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre a DMV nos estágios (foram agrupados os estágios I e II e os estágios III e IV). O valor  $P$  representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.

A densidade microvascular diminuída apresentou correlação com a recidiva tumoral ( $P=0,05$ ) e óbito ( $P=0,05$ ). O número de vasos contados foi maior entre os pacientes que não apresentaram metástases e que sobreviveram, apresentando-se como fator protetor na nossa casuística.



**Figura 20.** Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre a DMV nas recidivas tumorais.

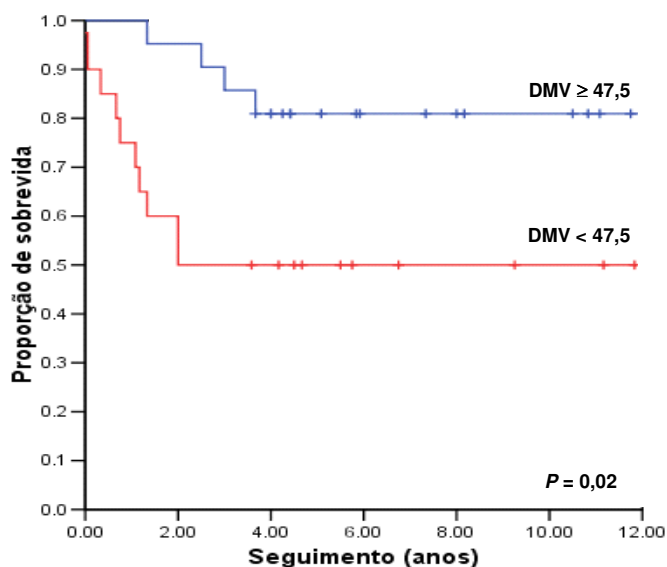
O valor  $P$  representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.



**Figura 21.** Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre a DMV e o óbito.

O valor  $P$  representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.

Os pacientes do grupo de maior densidade microvascular ( $\geq 47,5$  microvasos) apresentaram sobrevida significativamente maior do que os pacientes com DMV  $< 47,5$  microvasos. A curva abaixo demonstra isto.



**Figura 22. Curvas de sobrevida para pacientes com alta ( $\geq 47,5$  microvasos/campo) e baixa ( $< 47,5$  microvasos/campo) densidade microvascular em relação à mediana.**

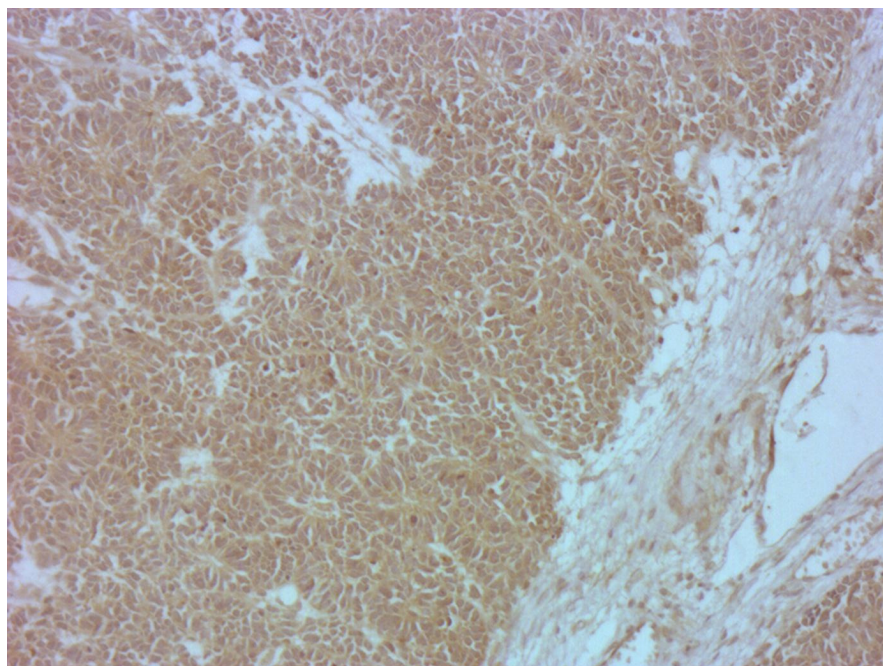
### 5.3 Expressão do Fator Tecidual

A expressão do fator tecidual em tumores de nossa amostra foi importante. Vinte casos (48,8%) expressaram o FT intensamente (graus III e IV) e vinte e um (51,2%) tiveram expressão negativa ou fraca (I e II).

**Tabela 7. Expressão do fator tecidual total em espécimes de Tumor de Wilms.**

Escore Fator Tecidual total	Número de amostras (%)
I (0-25%)	8 (19,5%)
II (26-50%)	13 (31,7%)
III (51-75%)	17 (41,5%)
IV (76-100%)	3 (7,3%)

A expressão do FT foi observada principalmente no citoplasma do componente histológico blastematoso e na membrana celular e no citoplasma do componente epitelial, sendo que o componente estromal não apresentou uma expressão significativa (apenas seis pacientes expressaram o FT no componente estromal e apenas em níveis I ou II). A expressão do FT total foi correlacionada ao FT encontrado no componente blastematoso com ( $p < 0,001$ ), pelo teste de Pearson.



**Figura 23. A expressão intensa do fator tecidual no componente blastematoso e expressão fraca no componente estromal.**

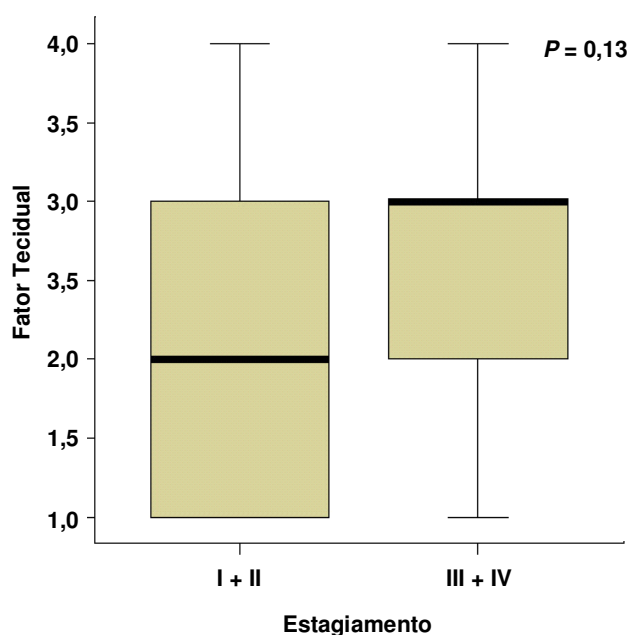
Não houve diferença estatística entre expressão imunoistoquímica do FT e idade dos pacientes ( $P=0,64$ ), do FT com a histologia (favorável/desfavorável) com um  $P=0,21$  e do FT e estadiamento ( $P=0,13$ ).

**Tabela 8. Comparação dos grupos de estagiamento I+II vs III+IV quanto à idade, fator tecidual e número de microvasos no “hotspot” de pacientes com tumor de Wilms, Porto Alegre, RS, 2007.**

<i>Variável</i>	<i>I + II</i>		<i>III + IV</i>		<i>P</i>
	<i>N</i>	<i>Mediana</i>	<i>n</i>	<i>mediana</i>	
Idade, anos	25	2,6 (0,3 a 7,3)	16	2,9 (1,0 a 6,9)	0,64
FT total	25	2 (1 a 4)	16	3 (1 a 4)	0,13
FT no blastema	21	2 (1 a 4)	15	2 (1 a 3)	0,61
FT epitelial	19	2 (1 a 4)	12	3 (1 a 4)	0,19
FT estromal	25	1 (1 a 4)	15	1 (1 a 3)	0,89
Nº médio de microvasos	25	54 (3 a 176)	16	33 (17 a 157)	0,40

Os dados são apresentados como mediana (mínimo a máximo)

FT: fator tecidual mensurado em escore arbitrário (1: 0 a 25%; 2: 26 a 50%; 3: 51 a 75% e 4: ≥76%); P: significância estatística obtida pelo teste U de Mann-Whitney.



**Figura 24. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o fator tecidual nos diferentes estagiamentos da SIOP-9 (foram agrupados os estágios I e II e os estágios III e IV).**

**O valor *P* representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.**

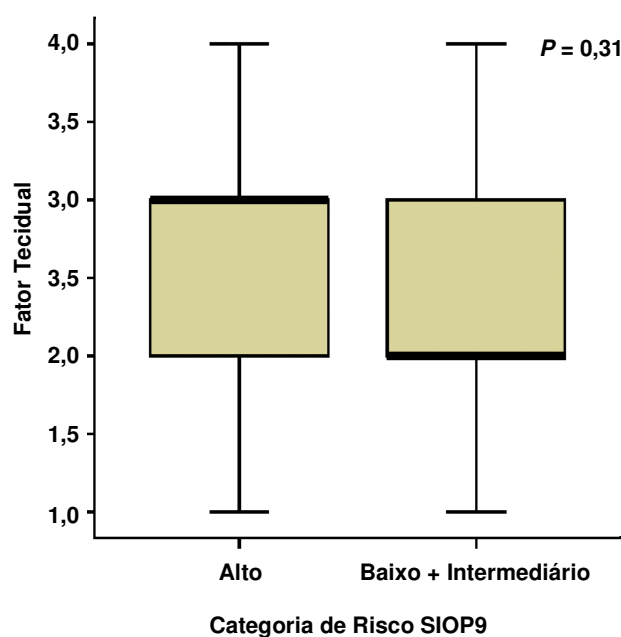
Também não encontramos diferença significativa entre a expressão do FT e a categoria de risco do paciente ( $P=0,31$ ), conforme Tabela 9 e Figura 25.

**Tabela 9. Comparação dos grupos de patologia de alto risco e risco baixo+intermediário quanto à idade, fator tecidual e número de microvasos no “hotspot” de pacientes com tumor de Wilms, Porto Alegre, RS, 2007.**

<i>Variável</i>	<i>Alto</i>		<i>Baixo + intermediário</i>		<i>P</i>
	<i>N</i>	<i>Mediana</i>	<i>n</i>	<i>mediana</i>	
Idade, anos	11	2,6 (0,7 a 6,9)	30	2,7 (0,3 a 7,3)	0,63
FT total	11	3 (1 a 4)	30	2 (1 a 4)	0,31
FT no blastema	11	3 (2 a 4)	25	2 (1 a 4)	0,16
FT epitelial	7	2 (1 a 4)	24	2 (1 a 4)	0,72
FT estromal	11	1 (1 a 2)	29	1 (1 a 4)	0,55
Nº médio de microvasos	11	35 (12 a 176)	30	53 (3 a 157)	0,50

Os dados são apresentados como mediana (mínimo a máximo)

FT: fator tecidual mensurado em escore arbitrário (1: 0 a 24.9%; 2: 25 a 49.9%; 3: 50 a 74.9% e 4:  $\geq 75\%$ ); P: significância estatística obtida pelo teste U de Mann-Whitney.



**Figura 25. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o fator tecidual nas categorias de risco da SIOP-9 (risco alto e intermediário/baixo). O valor *P* representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney**

Houve uma correlação positiva entre a expressão imunohistoquímica do FT e recidiva tumoral ( $P=0,01$ ) como vemos na Tabela 10 e Figura 26.

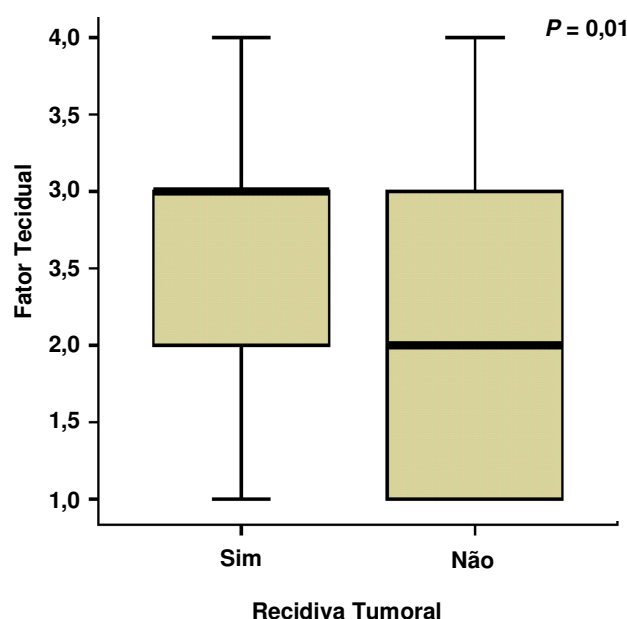
**Tabela 10. Comparação dos grupos com e sem recidiva quanto à idade, fator tecidual e número de microvasos no “hotspot” de pacientes com tumor de Wilms, Porto Alegre, RS, 2007.**

<i>Variável</i>	<i>Com Recidiva Tumoral</i>		<i>Sem Recidiva Tumoral</i>		<i>P</i>
	<i>N</i>	<i>Mediana</i>	<i>N</i>	<i>Mediana</i>	
Idade, anos	18	2,7 (1,3 a 7,3)	23	2,6 (0,3 a 7,0)	0,58
FT total	18	3 (1 a 4)	23	2 (1 a 4)	0,01
FT no blastema	16	3 (1 a 3)	20	2 (1 a 4)	0,06
FT epitelial	14	3 (1 a 4)	17	2 (1 a 4)	0,97
FT estromal	17	1 (1 a 4)	23	1 (1 a 2)	0,23
Nº médio de microvasos	18	31 (9 a 157)	23	66 (3 a 176)	0,05

Os dados são apresentados como mediana (mínimo a máximo)

FT: fator tecidual mensurado em escore arbitrário (1: 0 a 24,9%; 2: 25 a 49,9%; 3: 50 a 74,9% e 4:  $\geq 75\%$ );

P: significância estatística obtida pelo teste U de Mann-Whitney.



**Figura 26. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o fator tecidual nas recidivas tumorais.**

O valor *P* representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney



A expressão do FT apresentou correlação significativa ( $P=0,02$ ) com óbito, bem como o FT medido isoladamente no blastema ( $p<0,01$ ), Tabela 11.

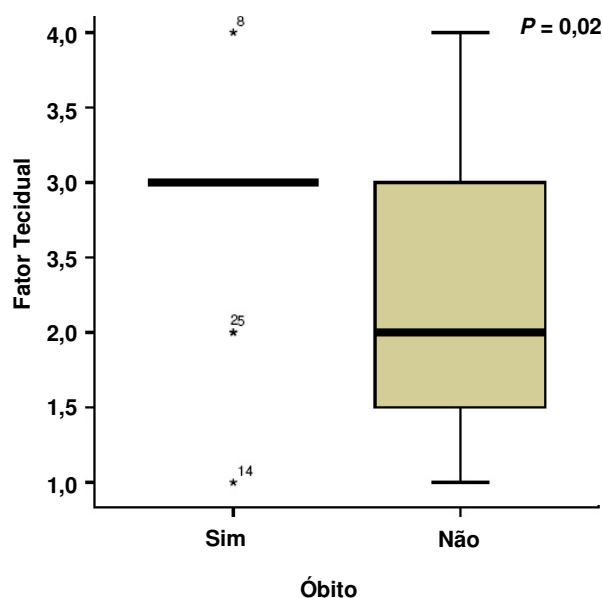
**Tabela 11. Comparação dos grupos óbito e sobrevivência quanto à idade, FT e número de microvasos no “hotspot” de pacientes com tumor de Wilms, Porto Alegre, RS, 2007.**

Variável	Óbito		Sobrevivência		P
	N	Mediana	n	mediana	
Idade, anos	14	2,6 (1,3 a 6,9)	27	2,8 (0,3 a 7,3)	0,92
FT total	14	3 (1 a 4)	27	2 (1 a 4)	0,02
FT no blastema	13	3 (2 a 3)	23	2 (1 a 4)	<0,01
FT epitelial	10	2 (1 a 4)	21	2 (1 a 4)	0,11
FT estromal	13	1 (1 a 4)	27	1 (1 a 2)	0,20
Nº médio de microvasos	14	31 (9 a 157)	27	56 (3 a 176)	0,05

Os dados são apresentados como mediana (mínimo a máximo)

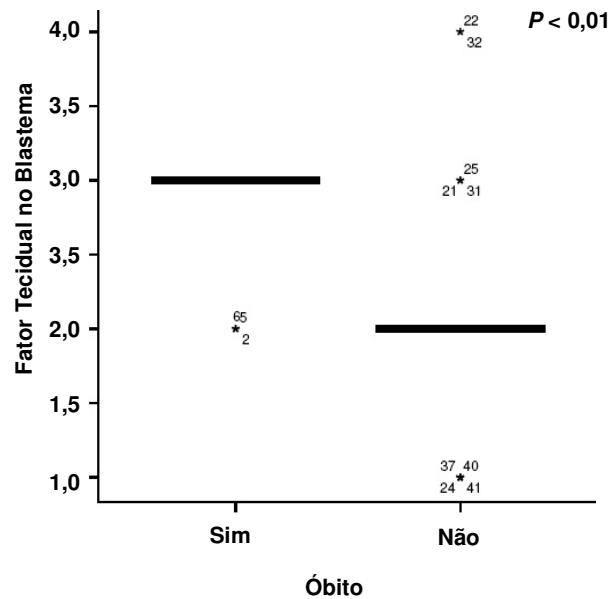
FT: fator tecidual mensurado em escore arbitrário (1: 0 a 24,9%; 2: 25 a 49,9%; 3: 50 a 74,9% e 4:  $\geq 75\%$ ); P: significância estatística obtida pelo teste U de Mann-Whitney.

Os gráficos abaixo (Figuras 27 e 28) demonstram a diferença significativa existente entre o FT total e óbito e o FT expresso no blastema e o óbito.



**Figura 27. Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o fator tecidual e o óbito.**

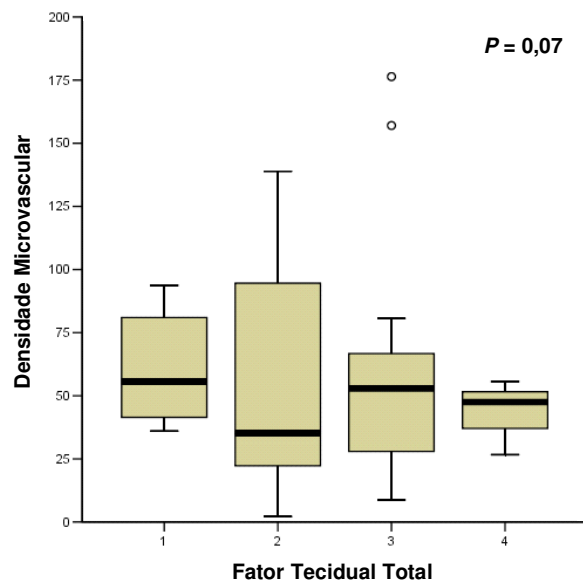
O valor  $P$  representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.



**Figura 28.** Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o fator tecidual expresso no blastema e óbito.

O valor  $P$  representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.

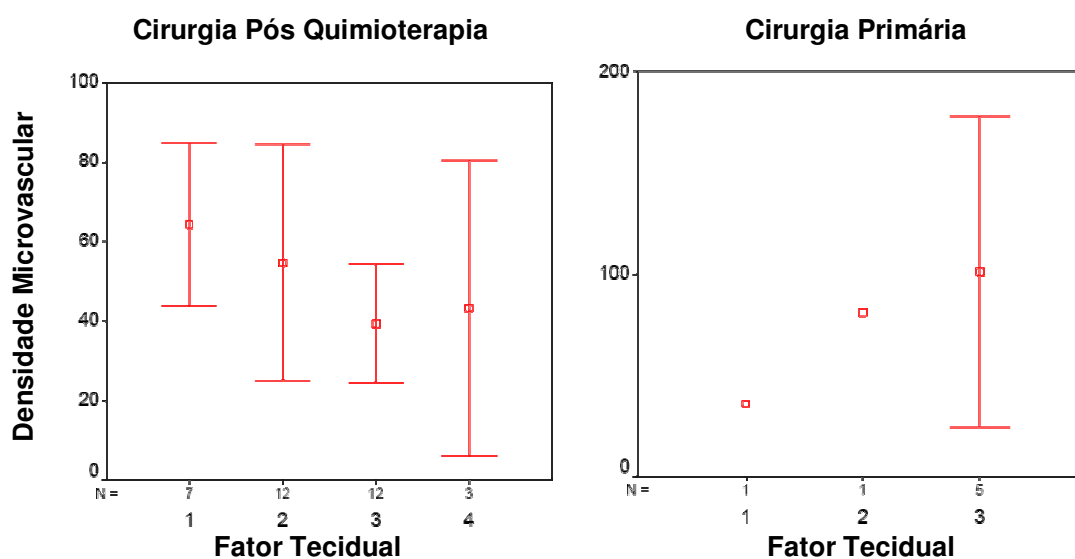
A análise comparativa entre a categoria do FT e número de microvasos não se mostrou estatisticamente significativa, com  $p=0,07$ .



**Figura 29.** Gráfico de “boxplot” representando a diferença entre o FT expresso nos diferentes escores (I a IV) e a DMV.

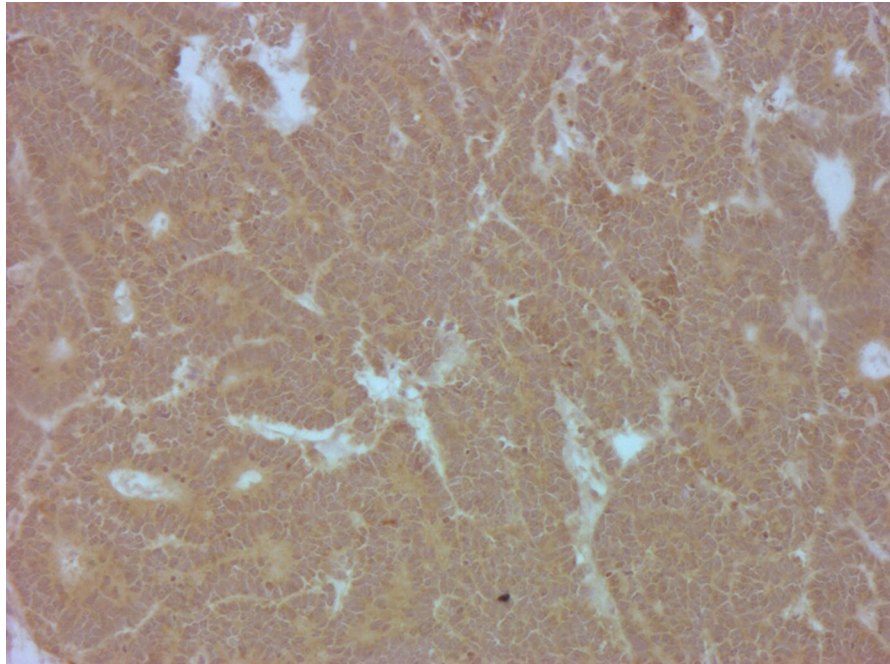
O valor  $P$  representa a significância estatística ao teste de Mann-Whitney.

Quando relacionamos a densidade microvascular com a expressão do fator tecidual, separando os grupos que foram submetidos à intervenção cirúrgica após quimioterapia e os que foram submetidos à cirurgia primária, encontramos uma tendência a quanto maior a expressão do FT, maior a DMV, mas o número de pacientes no grupo de cirurgia inicial era muito pequeno não tendo sido possível avaliar a significância estatística. Antes da comparação vimos que os grupos eram semelhantes.

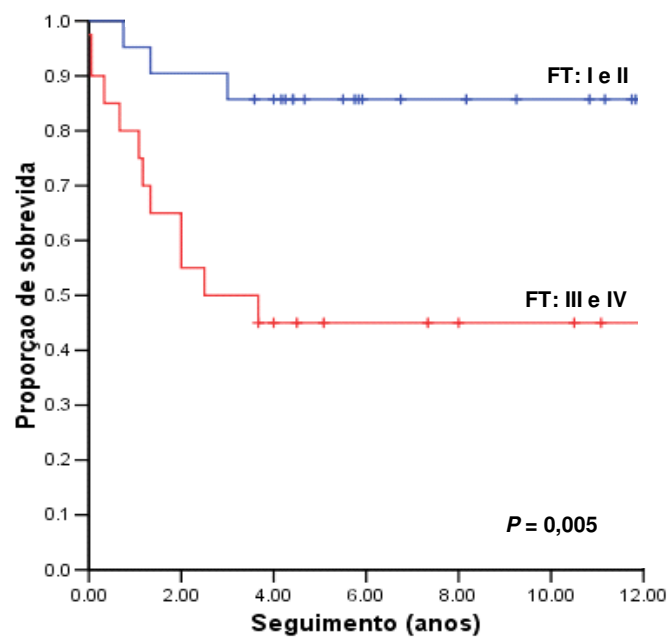


**Figura 30. Representação gráfica da expressão de FT e da densidade microvascular nos grupos com e sem quimioterapia pré-operatória.**

Os pacientes com alta expressão (III e IV) para o fator tecidual apresentaram sobrevida estatisticamente significativa menor do que os pacientes com baixa expressão do FT (I e II).



**Figura 31. Expressão do fator tecidual Categoria IV.**



**Figura 32. Curvas de sobrevivência para pacientes com alta expressão (III e IV) e baixa expressão (I e II) do fator tecidual.**

## 5.4 Análise Multivariada

Como a expressão aumentada do FT mostrou-se um fator estatisticamente significativo para determinação da mortalidade, foi realizada uma análise de regressão multivariável ajustada para os principais fatores prognósticos conhecidos, como estadiamento, idade, categoria de risco da SIOP e DMV. Nesta análise a expressão aumentada do FT permanece como um fator de prognóstico independente para uma maior mortalidade, enquanto a DMV aumentada aparece como fator determinante de uma menor mortalidade, conforme a Tabela 12.

**Tabela 12. Fatores associados com a ocorrência de óbito expressos por risco relativo (RR) e seu intervalo de confiança de 95% (IC95%).**

<i>Fator</i>	<i>Análise Bivariada</i>			<i>Regressão de Cox</i>		
	<i>RR</i>	<i>IC95%</i>	<i>P</i>	<i>HR</i>	<i>IC95%</i>	<i>P</i>
FT 3 e 4	5.1	1.4 a 18.3	0.01	9.9	2.3 a 43.497	<0.01
DMV $\geq$ 47.5 microvasos	0.3	0.1 a 0.9	0.03	0.1	<0.1 a 0.6	<0.01
Histologia SIOP I	1.2	0.4 a 3.6	0.69	0.8	0.1 a 6.8	0.82
Estadiamento 3 e 4	3.7	1.2 a 11.1	0.02	1.5	0.5 a 4.9	0.51
Idade > 2.6 anos	0.8	0.3 a 2.3	0.69	0.5	0.2 a 1.7	0.29
Categ. risco SIOP 1	2.0	0.7 a 6.9	0.21	2.8	0.3 a 26.2	0.37

FT: fator tecidual mensurado em escore arbitrário (1: 0 a 24.9%; 2: 25 a 49.9%; 3: 50 a 74.9% e 4:  $\geq$ 75%); DMS: densidade microvascular; SIOP: Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica; SIOP I: Tumores anaplásicos e blastematosos; RR: risco relativo; HR: razão de risco; IC95%: intervalo de confiança de 95%; P: significância estatística.

## 6 DISCUSSÃO

Embora o TW possa ser considerado como uma doença curável, a mortalidade em nossa casuística foi de 34%, apresentando uma sobrevida no final de dois anos de 78% e ao final do estudo de apenas 66%. Apesar da maioria dos trabalhos mostrarem uma mortalidade menor, o GCBTTW apresentou uma sobrevida de 80% ao final de dois anos e de 73% ao final de quatro anos<sup>29</sup> e o estudo da SIOP-9<sup>33</sup> mostrou uma ocorrência de apenas 71% dos pacientes com sobrevida livre de doença após dois anos de tratamento nos estágios II e III com anaplasia e estágios II com linfonodo positivo e III com histologia favorável, sendo a sobrevida global de 71% nos pacientes que apresentavam anaplasia e 85% nos sem anaplasia após cinco anos. A sobrevida do TW com histologia favorável descrita no NWTS-3 no estágio II é de 92,2%, no estágio III é de 86,9% e no IV é de 73% após 4 anos, apesar da terapia antitumoral agressiva.<sup>122</sup> Suita e cols.<sup>123</sup> em um levantamento realizado pelo Grupo Japonês de Estudos de Tumores Malignos Sólidos Pediátricos encontrou a sobrevida de 95,5% nos estágios I e II, mas nos estágios III e IV foi de 66,7% quando estudou 90 pacientes operados em 15 anos (1982-1996), sendo esta série de casos semelhante a nossa. A mortalidade relativamente elevada em nossa série provavelmente decorre da proporção significativa de pacientes nos estágios III e IV (39%) ao diagnóstico, diferentemente dos países desenvolvidos onde nas séries relatadas a maioria dos pacientes encontra-se nos estágios I e II.

O perfil epidemiológico dos pacientes no presente estudo, com idade variando desde quatro meses até 7 anos e 3 meses, com a mediana das idades de 2,6 anos e a média de  $3,0 \pm 1,8$  anos é semelhante à maioria dos trabalhos, sendo que a mediana das idades no GCBTTW é de 3 anos<sup>29</sup> e 90% dos pacientes estão abaixo dos 7 anos ao diagnóstico.<sup>32</sup> No estudo japonês<sup>123</sup> a média de idade foi de  $2,8 \pm 2,6$  anos. Em nosso estudo não houve correlação significativa entre a idade dos pacientes e a recidiva e/ou óbito, nem entre os pacientes com diferentes estagiamentos e histologia. A idade dos pacientes ao diagnóstico não foi fator determinante do óbito; a mediana das idades dos 27 pacientes que sobreviveram foi de 2,83 anos e a mediana das idades dos 14 pacientes que foram a óbito foi de 2,58 anos com  $P=0,92$ .

Em nossa casuística, tivemos 56,1% das crianças do sexo feminino, diferentemente da maioria dos estudos que mostra uma maior percentagem de meninos. Suita e cols.<sup>123</sup> encontraram 41% de meninas em seu trabalho, onde foram incluídos 90 pacientes operados com TW. No NWTS também encontramos uma leve predominância de meninos, com uma razão de meninos:meninas de 0,92:1,0. Talvez esta diferença deva-se ao fato de nossa casuística ser relativamente pequena (41 casos) ou em nosso país existir uma característica diferente da dos países mais desenvolvidos, já que no GCBTTW os sexos foram igualmente atingidos, sem predominância de nenhum deles.

Em nossa série, em consonância com a literatura, os tumores acometeram, na maioria das vezes, o rim esquerdo em 22 casos (53,7%), o rim direito em 17 casos (41,5%), e houve acometimento bilateral dos rins ao diagnóstico em dois casos (4,9%), sendo que Suita e cols.<sup>123</sup> também encontraram em sua série de 90 pacientes, 49 que acometeram o rim esquerdo (54,4%), 32 o rim direito (35,6%) e 9 pacientes tiveram acometimento bilateral dos rins (10%).

O estadiamento do tumor é um fator de prognóstico comprovado, sendo que nossa pesquisa mostrou uma correlação nítida entre o estadiamento dos tumores, recidiva tumoral e óbito dos pacientes, sendo que quanto maior o estadiamento, maior a taxa de recidiva e de óbito. Dos 18 pacientes que apresentaram recidiva tumoral, 12 pacientes encontravam-se nos estágios III e IV ao diagnóstico e seis encontravam-se nos estágios I e II ( $P=0,003$ ). Com relação ao óbito, quanto mais avançado o estadiamento maior a probabilidade de morte, com nove óbitos nos estágios III e IV, cinco óbitos no estágio II e nenhum óbito no estágio I ( $P=0,02$ ). O estadiamento utilizado foi o descrito pela SIOP-9,<sup>33</sup> porque a maioria dos nossos pacientes foi submetida à quimioterapia neo-adjuvante e apesar dos estadiamentos descritos pelo NWTS-3<sup>40,41</sup> e SIOP-9<sup>33,39</sup> serem os mais utilizados e diferirem muito pouco, o descrito pela SIOP apresenta os dados que podem ser encontrados com o uso da quimioterapia pré-operatória.

Ao examinarmos a curva de sobrevida dos nossos pacientes incluídos no estadiamento I e II eles apresentaram uma sobrevida acima de 80% após 10 anos de acompanhamento, enquanto que os de estágio III e IV apresentaram uma sobrevida abaixo de 50% ( $p=0,01$ ),

mostrando, como em outras séries, a diferença de evolução em relação ao estágio encontrado quando do diagnóstico.<sup>41,123</sup> A nossa casuística difere pouco da descrita na literatura com relação aos estágios mais precoces, mas ainda temos uma mortalidade superior em relação aos estágios mais avançados, quando analisamos os resultados dos grandes estudos cooperativos (SIOP, NWTS, UKCCSG).<sup>33,41</sup> As causas para este fato são incertas, mas poderiam apresentar correlação com o estado geral dos pacientes tratados, como por exemplo a desnutrição ou o diagnóstico tardio, uma vez que o tratamento quimioterápico e radioterápico realizados seguem os mesmos protocolos sugeridos pela SIOP-9. Em recidivas agressivas, quando a remoção completa do tumor é impossível, a resposta ao tratamento de resgate em nossos pacientes não se mostrou tão eficaz no controle da doença, pois dos 18 pacientes que recidivaram, 14 foram ao óbito. Um estudo realizado no “Saint Jude Childrens’ Research Hospital” mostrou que pacientes que tiveram recorrência local do TW tiveram maior sobrevida quando houve ressecção completa do tumor na segunda cirurgia em relação àqueles em que houve ressecção parcial do tumor ou naqueles em que não foi realizada a cirurgia,<sup>124</sup> mostrando-nos a importância da cirurgia dentro do tratamento multidisciplinar do TW. Existem importantes avanços no tratamento do TW que foram incorporados aos novos protocolos de tratamento. A demonstração clara da importância da biópsia dos linfonodos, pois o seu comprometimento muda o estadiamento e o tratamento, o reconhecimento de que a ruptura, mesmo localizada durante a cirurgia predispõe os pacientes à recorrência local e que este paciente deve ser tratado como estágio III e a identificação de fatores prognósticos de má evolução, que aumentam o risco de recidiva e morte, devem ser utilizados para planejar o tratamento do paciente com TW.

A histologia é um dos fatores mais importantes para o prognóstico dos TW, sendo a classificação do NWTS a mais utilizada. No NWTS, 89% dos pacientes apresentam HF e 11% dos pacientes apresentam HD. Em nosso estudo, 38 apresentaram HF (92,7%), enquanto apenas três pacientes apresentaram HD (7,3%); 100% dos pacientes com HD foram a óbito. A classificação da SIOP-9 em categorias de risco (baixo, intermediário e alto) foi estudada de maneira retrospectiva e não encontramos significância estatística em relação à recidiva e ao óbito, talvez esta reclassificação realizada de forma retrospectiva tenha gerado um viés ou o número de casos não foi suficiente para apresentar significância estatística.



Este estudo demonstra pela primeira vez a expressão imunohistoquímica do FT no tumor de Wilms em tecidos humanos. A expressão do antígeno ocorre especialmente na região do blastema e do epitélio nos tumores, mas ou não se expressa ou se expressa fracamente no tecido estromal. O presente estudo mostrou que apenas 19,5% (oito pacientes) das células tumorais do TW não expressou ou expressou fracamente o FT (0 a 25%). Apesar do número relativamente pequeno de pacientes estudados (N=41), verificamos uma associação estatisticamente significativa entre recidiva tumoral e expressão do FT ( $p=0,01$ ) e óbito e expressão do FT ( $p=0,02$ ). Podemos dizer que o FT pode ser considerado como um fator de prognóstico independente nos tumores de Wilms em nosso estudo. Este achado reproduz outros vários trabalhos na literatura em diferentes tumores (próstata,<sup>15,117,118</sup> mama,<sup>119,120</sup> melanomas,<sup>114</sup> etc.) nos quais a alta expressão do FT também foi fator prognóstico adverso. A compreensão do papel do FT sobre a progressão do TW pode ser de importância vital não somente para termos mais um fator de prognóstico, mas também para abrir portas ao desenvolvimento de novos tratamentos oncológicos.

Apesar da expressão do FT haver demonstrado correlação com recidiva e óbito em nossa casuística, não houve uma correlação positiva entre a expressão de FT e a DMV ( $P=0,07$ ), ao contrário de outros estudos na literatura contemplando outros tumores.<sup>15,19,54</sup> Este achado nos causou surpresa, porém há que ressaltar o fato de que a grande maioria de nossos pacientes realizou quimioterapia pré-operatória, podendo a mesma haver afetado substancialmente a análise da DMV. Na figura 31, na qual está demonstrada a relação entre FT, DMV e pacientes com quimioterapia neo-adjuvante ou com cirurgia primária, encontramos uma tendência a uma correlação positiva entre o FT e a DMV, mas devido ao pequeno número de pacientes no segundo grupo não nos foi possível o estudo da significância estatística. Isto nos possibilita formular a hipótese de que talvez o FT seja um marcador mais estável de angiogênese tumoral do que a própria contagem de vasos (DMV).

Apesar de ser foco de pesquisas há vários anos, a análise da angiogênese tumoral apresenta várias limitações técnicas, como a falta de uma padronização na seleção da área a ser avaliada (“hot spot”), a preservação antigênica que pode diferir de acordo com o tempo de armazenamento e a qualidade da parafina, a indefinição do aumento óptico ideal a ser utilizado, a possibilidade de erros de aferição e a utilização de diferentes anticorpos. O teste da

reação em cadeia da polimerase em tempo real (“real-time polymerase chain-reaction, RT-PCR) tem sido utilizado de maneira crescente em nosso meio, porém ainda há limitações na tecnologia, na dificuldade de pessoal treinado e nos altos custos. Provavelmente, de um somatório destes fatores decorrem os nossos resultados controversos sobre a pesquisa da DMV.

A microcirculação dos tumores em geral costuma ser heterogênea e a presença do “hot-spot” indica a presença de clones de células tumorais com alto potencial angiogênico, podendo refletir a parte mais agressiva do tumor.<sup>29</sup> Os anticorpos mais utilizados atualmente para a aferição da DMV são o anti-CD31 e o anti-CD34, sendo que a escolha do CD-34 em nosso estudo baseou-se em uma pesquisa onde Skoldenberg<sup>29</sup> viu que os melhores anticorpos na avaliação da DMV no TW eram o CD34 com uma sensibilidade de 99% e o CD31 com 96%. Mesmo assim, estes anticorpos podem corar estruturas de origem não endotelial formando um “background”, podendo nos levar a cometer erros de aferição. Relatos recentes têm demonstrado que o anticorpo CD34 confere uma coloração reprodutível, sem apresentar problemas como reação cruzada com células de vasos linfáticos ou eritrócitos, sendo mais específico e sensível do que o vW.<sup>125</sup>

Em nosso estudo, a avaliação da densidade microvascular não apresentou correlação positiva com os fatores de prognóstico estabelecidos, nem com recidivas ou óbito. Na verdade, constatamos uma correlação negativa entre a maior densidade microvascular e os desfechos recidiva/óbito. As explicações para este achado provavelmente estão no fato de que a grande maioria dos nossos pacientes realizou quimioterapia neoadjuvante. Folkmann<sup>126</sup> descreveu que muitos agentes quimioterápicos atuam como inibidores da angiogênese, além de induzirem a morte direta da célula tumoral. Em um estudo sobre o impacto da DMV na sobrevida livre de recorrência de pacientes com neoplasia da mama, Van Hoef e cols.<sup>127</sup> hipotetizaram que quando a DMV está aumentada no tumor, há também uma permeabilidade vascular no tumor, o que facilitaria o acesso dos tratamentos quimioterápicos a áreas hipervascularizadas, potencializando as chances de resposta terapêutica a tratamentos sistêmicos. Protopapa e cols.<sup>128</sup> também demonstraram que a angiogênese pode ser um fator preditivo de boa resposta ao tratamento quimioterápico neo-adjuvante no câncer de mama.

No entanto, Skoldenberg<sup>29</sup> também avaliou pacientes que foram submetidos a quimioterapia neoadjuvante em TW, e observou que, apesar desta extinguir a fração mais agressiva das células tumorais, ela deixava o componente resistente a quimioterapia viável, assim como os focos anaplásicos, encontrando correlação entre a DMV e fatores prognósticos. Apesar de se acreditar que a quantificação estereológica em toda lâmina pudesse ser mais fidedigna do que a contagem dos “hot spots”, Skoldenberg<sup>29</sup> não encontrou diferença em um estudo comparativo dos dois métodos.

Weidner e cols.<sup>129</sup> encontraram que todos os pacientes com carcinoma de mama com  $101 \pm 49,3$  microvasos ou mais por campo de magnificação de 200x tiveram recorrência tumoral até 33 meses após o diagnóstico comparados com menos de 5% de recidiva em pacientes com  $45 \pm 21,1$  microvasos ou menos por campo. Em seu primeiro estudo, Weidner e cols.<sup>53</sup> concluíram que os únicos preditores de mortalidade em mulheres com tumores malignos de mama com linfonodo negativo foi a DMV ( $P < 0,001$ ) e o grau histológico ( $P = 0,04$ ). O número de microvasos por campo no estudo de Weidner também variou muito. Em nosso estudo o número de microvasos variou de 3 a 176 com uma mediana de 47,5 microvasos, enquanto que no estudo de Weidner e cols. a DMV variou de 16-220 microvasos nos casos em que houve recidiva e foram classificados de tumores hipervascularizados e de 15-100 vasos nos casos de bom prognóstico.<sup>129</sup> Em nossa casuística utilizamos a mediana para ponto de corte entre os dois grupos de tumores conforme a DMV.

A angiogênese tumoral e a resultante disseminação metastática, entretanto, são eventos multifatoriais dependentes de um balanço estrito entre agentes pró e anti-angiogênicos.<sup>50</sup> Outros mecanismos e interações precisam ser esclarecidos, eventualmente com séries maiores de pacientes, para que se possa ampliar a compreensão sobre a regulação de mecanismos de coagulação por neoplasias malignas e seu efeito sobre a produção de vasos sanguíneos e sobre a evolução da doença.

A análise multivariada, onde são ajustados os potenciais fatores de confusão, mostrou em nossa pesquisa que a expressão do FT continua com poder suficiente para influenciar no prognóstico dos pacientes (fator prognóstico independente), assim como a DMV (fator

protetor). Um novo marcador histológico que identifique quais crianças do grupo de HF tem alto risco para recidiva seria de grande validade.

Um outro campo de aplicação do conhecimento da participação do FT na progressão dos tumores é o do diagnóstico e acompanhamento de indivíduos portadores de neoplasias malignas. Lwalled e cols.<sup>16</sup> realizaram dosagens urinárias de FT em pacientes portadores de neoplasias de bexiga e próstata e observaram que o diagnóstico de tumores malignos era acompanhado de aumento significativo dos níveis urinários de FT, sendo que havia também uma relação entre estes índices e o grau de diferenciação histológica das lesões. Pacientes que evoluíram para óbito em função da doença apresentam os maiores valores dentre os casos incluídos na amostra. Cabe agora investigar se a dosagem do FT na urina poderá vir a ser útil como um parâmetro não somente prognóstico, mas também como um instrumento para a detecção de recorrências tumorais precoces.

O fato de que alguns de nossos pacientes com TW, apesar da histologia favorável, seguirem seu curso com óbito nos estimulou a procurar novos alvos de tratamento além dos já existentes, assim como fatores prognósticos de fácil realização, com a sua verificação no soro ou urina. O presente estudo enquadra-se na linha de pesquisa da Pós-graduação em Medicina, área de concentração em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que estuda a angiogênese e marcadores tumorais em vários tumores. Nossa linha de pesquisa prevê estudos avaliando o potencial da dosagem do FT como marcador sérico e/ou urinário de diversas neoplasias para as quais tal instrumento ainda não está disponível.

Finalmente, devemos mencionar que a possibilidade de empregar drogas anti-FT na terapêutica de tumores com alta expressão desta proteína, poderá fornecer avanços indiscutíveis no manejo de várias neoplasias. Este será o objetivo de novos estudos clínicos em nossa linha de pesquisa.

## 7 CONCLUSÕES

1. A idade dos pacientes não demonstrou correlação significativa com outros fatores prognósticos, recidivas ou óbitos. O estadiamento patológico não demonstrou correlação positiva com outros fatores prognósticos, mas foi determinante da ocorrência de recidivas e óbitos. A histologia descrita pelo NWTS (HF e HD) não foi determinante de recidivas, mas foi de óbitos. As categorias de risco descritas pela SIOP-9 não foram capazes de determinar a ocorrência de recidivas ou de óbitos.
2. A DMV variou entre 3 e 176 microvasos, com mediana de 47,5 microvasos.
3. O FT foi expresso na membrana celular e no citoplasma das células tumorais de pacientes com TW, sendo que 48,8% das amostras apresentavam >50% das células tumorais com expressão intensa de FT e 31,7% das amostras apresentavam expressão moderada do FT (26 a 50%). O FT foi expresso nos componentes blastematoso e epitelial do TW, mas não houve expressão importante no componente estromal.
4. Não houve correlação significativa entre a expressão imunistoquímica do FT e a DMV.
5. A DMV não apresentou correlação com idade, estadiamento e histologia. Em nossa casuística, houve uma correlação inversa entre DMV, recidivas e óbito. Na análise de regressão multivariável a DMV aumentada aparece como fator determinante de uma menor mortalidade.
6. A expressão imunistoquímica do FT não apresentou correlação positiva com fatores como idade, estadiamento e histologia, mas apresentou correlação significativa com recidiva e óbito. Na análise de regressão multivariada o FT permanece como um fator de prognóstico independente para uma maior mortalidade.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blakely ML, Ritchey ML. Controversies in the management of Wilms' tumor. *Semin Pediatr Surg.* 2001;10(3):127-31.
2. Farhat W, McLorie G, Capolicchio G. Wilms' tumor: surgical considerations and controversies. *Urol Clin North Am.* 2000;27(3):455-62.
3. Graf N, Tournade MF, de Kraker J. The role of preoperative chemotherapy in the management of Wilms' tumor: The SIOP studies. *Urol Clin North Am.* 2000;27(3):443-54.
4. Abramson LP, Grundy PE, Rademaker AW, Helenowski I, Cornwell M, Katzenstein HM, et al. Increased microvascular density predicts relapse in Wilms' tumor. *J Pediatr Surg.* 2003;38(3):325-30.
5. Williams RD, Hing SN, Greer BT, Whiteford CC, Wei JS, Natrajan R, et al. Prognostic classification of relapsing favorable histology Wilms tumor using cDNA microarray expression profiling and support vector machines. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;41(1):65-79.
6. Dome JS, Coppes MJ. Recent advances in Wilms tumor genetics. *Curr Opin Pediatr.* 2002;14(1):5-11.
7. Ghanem MA, Van der Kwast TH, Den Hollander JC, Sudaryo MK, Oomen MH, Noordzij MA, et al. Expression and prognostic value of Wilms' tumor 1 and early growth response 1 proteins in nephroblastoma. *Clin Cancer Res.* 2000;6(11):4265-71.
8. Sredni ST, de Camargo B, Lopes LF, Teixeira R, Simpson A. Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic indicator in Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol.* 2001;37(5):455-8.
9. Huang J, Soffer SZ, Kim ES, Yokoi A, Moore JT, McCrudden KW, et al. p53 accumulation in favorable-histology Wilms tumor is associated with angiogenesis and clinically aggressive disease. *J Pediatr Surg.* 2002;37(3):523-7.

10. Kim E, Moore J, Huang J, Soffer S, Manley CA, O'Toole K, et al. All angiogenesis is not the same: distinct patterns of response to antiangiogenic therapy in experimental neuroblastoma and Wilms Tumor. *J Ped Surg.* 2001;36(2):287-90.
11. Sköldenberg EG, Christiansson J, Sandstedt B, Larsson A, Läckgren G, Christofferson R. Angiogenesis and angiogenic growth factors in Wilms tumor. *J Urol.* 2001;165(6 Pt 2):2274-9.
12. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature.* 1996;383(6595):73-5.
13. Rosen ED, Chan JC, Idusogie E, Clotman F, Vlasuk G, Luther T, et al. Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature.* 1997;390(6657):290-4.
14. Nakagawa K, Zhang Y, Tsuji H, Yoshizumi M, Kasahara T, Nishimura H, et al. The angiogenic effect of tissue factor on tumors and wounds. *Semin Thromb Hemost.* 1998;24(3):207-10.
15. Carvalhal GF. Análise imuno-histoquímica da expressão do fator tecidual no câncer de próstata em humanos: correlação com angiogênese e aspectos clínico-patológicos [tese]. [São Paulo (SP)]: Universidade de São Paulo; 2001. 142p.
16. Lwaleed BA, Francis JL, Chisholm M. Urinary tissue factor levels in patients with bladder and prostate cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2000;26(1):44-9.
17. Fillmann LS. A expressão do fator tecidual no adenocarcinoma colo-retal: relação com angiogênese e aspectos clínico-patológicos [tese]. [Porto Alegre (RS)]: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006. 81p.
18. Toneto MG. Análise imunoistoquímica da expressão do fator tecidual e da densidade microvascular no câncer gástrico: correlação com fatores prognósticos e sobrevida [tese]. [Porto Alegre (RS)]: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006. 88 p.
19. Koomägi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer.* 1998;79(1):19-22.
20. Kakkar AK, Lemoine NR, Scully MF, Tebbutt S, Williamson RC. Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. *Br J Surg.* 1995;82(8):1101-4.

21. Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF, Pawashe A, Garen A. Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(18):8205-9.
22. Zhang Y, Deng Y, Luther T, Müller M, Ziegler R, Waldherr R, et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest*. 1994;94(3):1320-7.
23. Bognacki J, Hammelburger J. Functional and immunologic methods for the measurement of human tissue factor pathway inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1995;6(Suppl 1):S65-72.
24. Fareed J, Callas DD, Hoppensteadt D, Bermes EW Jr. Tissue factor antigen levels in various biological fluids. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1995;6(Suppl 1):S32-6.
25. Francis JL, Carvalho M, Francis DA. The clinical value of tissue factor assays. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1995;6(Suppl 1):S37-44.
26. Lwaleed BA, Bass PS, Francis JL. Urinary tissue factor: a potential marker of disease. *J Pathol*. 1999;188(1):3-8.
27. Lwaleed BA, Francis JL, Chisholm M. Monocyte tissue factor levels in patients with urological tumors: an association between tumor presence and progression. *BJU Int*. 1999;83(4):476-82.
28. Lwaleed BA, Francis JL, Chisholm M. Tissue factor assays as diagnostic tools for cancer? Correlation between urinary and monocyte tissue factor activity. *J Hematother Stem Cell Res*. 1999;8(6):659-68.
29. de Camargo B. Tumor de Wilms. In: Maksoud JG. *Cirurgia pediátrica*. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p.1005-18.
30. Othersen Jr. HB, Tagge EP, Garvin AJ. Wilm's tumor. In: O'Neill Jr. JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG. *Pediatric surgery*. 5<sup>th</sup>.ed. St. Louis: Mosby; 1998. p.391-403.
31. D'Angio GJ. Pre- or post-operative treatment for Wilms tumor? Who, what, when, where, how, why--and which. *Med Pediatr Oncol*. 2003;41(6):545-9.
32. de Camargo B. Formação de um grupo cooperativo brasileiro para o tratamento do tumor de Wilms. *J Bras Urol*. 1987;13(2):52-6.



33. Delemarre JF, Sandstedt B, Harms D, Boccon-Gibod L, Vujanić GM. The new SIOP (Stockholm) working classification of renal tumours of childhood. *International Society of Paediatric Oncology. Med Pediatr Oncol.* 1996;26(2):145-6.
34. Beckwith JB. National Wilms Tumor Study: an update for pathologists. *Pediatr Dev Pathol.* 1998;1(1):79-84.
35. Perlman EJ. Pediatric renal tumors: practical updates for the pathologist. *Pediatr Dev Pathol.* 2005;8(3):320-38.
36. Breslow N, Beckwith JB, Ciol M, Sharples K. Age distribution of Wilms' tumor: report from the National Wilms' Tumor Study. *Cancer Res.* 1988;48(6):1653-7.
37. Pastore G, Carli M, Lemerle J, Tournade MF, Voute PA, Rey A, et al. Epidemiological features of Wilms' tumor: results of studies by the International Society of Paediatric Oncology (SIOP). *Med Pediatr Oncol.* 1988;16(1):7-11.
38. Perlman EJ, Grosfeld JL, Togashi K, Boccon-Gibod L. Nephroblastoma. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn JA, editors. *Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs.* Lyon: IARC Press; 2004. p.48-52. [World Health Organization Classification of Tumors Series]
39. Vujanić GM, Harms D, Sandstedt B, Weirich A, de Kraker J, Delemarre JF. New definitions of focal and diffuse anaplasia in Wilms tumor: the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) experience. *Med Pediatr Oncol.* 1999;32(5):317-23.
40. Faria P, Beckwith JB, Mishra K, Zuppan C, Weeks DA, Breslow N, et al. Focal versus diffuse anaplasia in Wilms tumor--new definitions with prognostic significance: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *Am J Surg Pathol.* 1996;20(8):909-20.
41. Green DM, D'Angio GJ, Beckwith JB, Breslow NE, Grundy PE, Ritchey ML, et al. Wilms tumor. *CA Cancer J Clin.* 1996;46(1):46-63.
42. Boulanger SC, Caty MG, Glick PL. Molecular biology for the pediatric surgeon. *J Pediatr Surg.* 1999;34(6):917-30.
43. Knudson Jr. AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-3.
44. Knudson Jr. AG, Strong LC. Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst.* 1972;48(2):313-24.

45. Riccardi VM, Sujansky E, Smith AC, Francke U. Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics*. 1978;61(4):604-10.
46. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*. 1990;60(3):509-20.
47. Koufos A, Hansen MF, Lampkin BC, Workman ML, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilms' tumour. *Nature*. 1984;309(5964):170-2.
48. Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ 3rd, Hill DE, et al. Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(11):5100-4.
49. Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, et al. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature*. 1993;362(6422):749-51.
50. Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastro-intestinal tumours. *Eur J Cancer*. 1996;32A(14):2501-5.
51. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57.
52. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285(21):1182-6.
53. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991; 324(1):1-8.
54. Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol*. 2000;31(4):443-7.
55. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002;29(6 Suppl 16):15-8.
56. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(1):4-6.

57. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol*. 2001;19(4):1207-25.
58. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. 1992;267(16):10931-4.
59. Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J, Zhao H, Brodeur GM, Himelstein BP. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res*. 2000;6(5):1900-8.
60. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med*. 1971;133(2):275-88.
61. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):505-15.
62. Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*. 1984;223(4642):1296-9.
63. Saclarides TJ. Angiogenesis in colorectal cancer. *Surg Clin North Am*. 1997;77(1):253-60.
64. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer*. 1996; 32A(14):2451-60.
65. Tarta C, da Silva VD, Teixeira CR, Prolla JC, Meurer L, Neto CC, et al. Digital image analysis and stereology of angiogenesis in polypoid and nonpolypoid colorectal adenomas. *Anal Quant Cytol Histol*. 2004;26(4):201-6.
66. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96(5):379-94.
67. Lin RY, Argenta PA, Sullivan KM, Adzick NS. Diagnostic and prognostic role of basic fibroblast growth factor in Wilms' tumor patients. *Clin Cancer Res*. 1995;1(3):327-31.
68. Ghanem MA, van Steenbrugge GJ, Sudaryo MK, Mathoera RB, Nijman JM, van der Kwast TH. Expression and prognostic relevance of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (FLT-1) in nephroblastoma. *J Clin Pathol*. 2003;56(2):107-13.
69. Kayton ML, Rowe DH, O'Toole KM, Thompson RB, Schwarz MA, Stolar CJ, et al. Metastasis correlates with production of vascular endothelial growth factor in a murine model of human Wilms' tumor. *J Pediatr Surg*. 1999;34(5):743-8.

70. Rowe DH, Kayton ML, O'Toole KM, Ingram M, Stolar CJ, Kandel JJ. Pathological angiogenesis in a murine model of human Wilms' tumor. *J Pediatr Surg.* 1999;34(5):676-9.
71. Rowe DH, Huang J, Kayton ML, Thompson R, Troxel A, O'Toole KM, et al. Anti-VEGF antibody suppresses primary tumor growth and metastasis in an experimental model of Wilms' tumor. *J Pediatr Surg.* 2000;35(1):30-3.
72. Huang J, Moore J, Soffer S, Kim E, Rowe D, Manley CA, et al. Highly specific antiangiogenic therapy is effective in suppressing growth of experimental Wilms tumors. *J Pediatr Surg.* 2001;36(2):357-61.
73. Karth J, Ferrer FA, Perlman E, Hanrahan C, Simons JW, Gearhart JP, et al. Coexpression of hypoxia-inducible factor 1-alpha and vascular endothelial growth factor in Wilms' tumor. *J Pediatr Surg.* 2000;35(12):1749-53.
74. Nakagawa S, Nishimaki T, Suzuki T, Kanda T, Kuwabara S, Hatakeyama K. Tumor angiogenesis as an independent prognostic factor after extended radical esophagectomy for invasive squamous cell carcinoma of the esophagus. *Surgery.* 2001;129(3):302-8.
75. Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol.* 2003;9(7):1604-6.
76. Tsujitani S, Saito H, Maeta Y, Yamaguchi K, Tatebe S, Kondo A, et al. Neoangiogenesis in patients with gastric carcinoma in relation to the expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. *Anticancer Res.* 2004;24(3b):1853-9.
77. Tarta C. Análise digital de imagem e estereologia da angiogênese em adenomas e no carcinoma colorretal invasivo de submucosa [tese]. [Porto Alegre (RS)]: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003. 101 p.
78. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum.* 1994;37(9):921-6.
79. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, et al. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 1997;57(6):1043-6.
80. Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic

- features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005;4(2):220-6.
81. Näyhä V, Viitanen T, Stenbäck F. Altered extent, pattern and characteristics of microvascular density are indicators of neoplastic progression in the endometrium. *Int J Cancer.* 2005;115(6):975-80.
  82. Cantu De León D, Lopez-Graniel C, Frias Mendivil M, Chanona Vilchis G, Gómez C, De La Garza Salazar J. Significance of microvascular density (MVD) in cervical cancer recurrence. *Int J Gynecol Cancer.* 2003;13(6):856-62.
  83. Banner BF, Whitehouse R, Baker SP, Swanson RS. Tumor angiogenesis in stage II colorectal carcinoma: association with survival. *Am J Clin Pathol.* 1998;109(6):733-7.
  84. Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, Pählman L, Bergström R, Glimelius B. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 1996;14(2):461-6.
  85. Cianchi F, Palomba A, Messerini L, Boddi V, Asirelli G, Perigli G, et al. Tumor angiogenesis in lymph node-negative rectal cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis. *Ann Surg Oncol.* 2002;9(1):20-6.
  86. Abdalla SA, Behzad F, Bsharah S, Kumar S, Amini SK, O'Dwyer ST, et al. Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours. *Oncol Rep.* 1999;6(4):839-42.
  87. Boxer GM, Tsiompanou E, Levine T, Watson R, Begent RH. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and microvessel counting as prognostic indicators in node-negative colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2005;26(1):1-8.
  88. Tan G, Cioc AM, Perez-Montiel D, Ellison EC, Frankel WL. Microvascular density does not correlate with histopathology and outcome in neuroendocrine tumors of the pancreas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2004;12(1):31-5.
  89. Brieger J, Bedavanija A, Lehr HA, Maurer J, Mann WJ. Expression of angiogenic growth factors in acoustic neurinoma. *Acta Otolaryngol.* 2003;123(9):1040-5.
  90. Sönmezer M, Güngör M, Ensari A, Ortaç F. Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer: in association with transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor. *Int J Gynecol Cancer.* 2004;14(1):82-8.
  91. Carmeliet P, Collen D. Tissue factor. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998;30(6):661-7.

92. Banner DW. The factor VIIa/tissue factor complex. *Thromb Haemost.* 1997; 78(1):512-5.
93. Higashi S, Iwanaga S. Molecular interaction between factor VII and tissue factor. *Int J Hematol.* 1998;67(3):229-41.
94. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):1015-22.
95. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernández-Ortiz A, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1997;95(3):594-9.
96. Jang Y, Guzman LA, Lincoff AM, Gottsauner-Wolf M, Forudi F, Hart CE, et al. Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation.* 1995;92(10):3041-50.
97. Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest.* 2003;124(3 Suppl):58S-68S.
98. Rickles FR, Levine MN. Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol.* 2001;106(1-2):6-12.
99. Prandoni P, Lensing AW, Büller HR, Cogo A, Prins MH, Cattelan AM, et al. Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med.* 1992;327(16):1128-33.
100. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Broze GJ Jr. Effect of tissue factor deficiency on mouse and tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(13):6922-6.
101. Fischer EG, Ruf W, Mueller BM. Tissue factor-initiated thrombin generation activates the signaling thrombin receptor on malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 1995;55(8):1629-32.
102. Ollivier V, Chabbat J, Herbert JM, Hakim J, de Prost D. Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1374-81.
103. Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(1):31-44.

104. Zhang J, Ding J, Zhang X, Shao X, Hao Z. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) production and angiogenesis by tissue Factor (TF) in SGC-7901 gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2005;4(7):769-72.
105. Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med.* 1996;2(2):167-8.
106. Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A, Ishigami S, Arii S, et al. et al. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer.* 2000;88(2):295-301.
107. Mousa SA. Tissue factor/VIIa in thrombosis and cancer. *Methods Mol Med.* 2004;93:119-32.
108. Amirkhosravi A, Meyer T, Warnes G, Amaya M, Malik Z, Biggerstaff JP, et al. Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost.* 1998;80(4):598-602.
109. Rickles FR, Shoji M, Abe K. The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *Int J Hematol.* 2001;73(2):145-50.
110. Abe K, Shoji M, Chen J, Bierhaus A, Danave I, Micko C et al. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(15):8663-8.
111. Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A, Vlasuk GP, Rote WE, Green SJ, et al. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res.* 2003;63(11):2997-3000.
112. Weidner N. Angiogenesis as a predictor of clinical outcome in cancer patients [editorial]. *Hum Pathol.* 2000;31(4):403-5.
113. Akashi T, Furuya Y, Ohta S, Fuse H. Tissue factor expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Urology.* 2003;62(6):1078-82.
114. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med.* 1996;2(2):209-15.
115. Vrana JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by

- carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res.* 1996;56(21):5063-70.
116. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol.* 2002;69(4):247-54.
  117. Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, et al. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005;11(7):2531-9.
  118. Kakkar AK, Chinswangwatanakul V, Tebbutt S, Lemoine NR, Williamson RC. A characterization of the coagulant and fibrinolytic profile of human pancreatic carcinoma cells. *Haemostasis.* 1998;28(1):1-6.
  119. Khorana AA, Fine RL. Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol.* 2004;5(11):655-63.
  120. Poon RT, Lau CP, Ho JW, Yu WC, Fan ST, Wong J. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(14):5339-45.
  121. Kaido T, Oe H, Yoshikawa A, Mori A, Arie S, Imamura M. Tissue factor is a useful prognostic factor of recurrence in hepatocellular carcinoma in 5-year survivors. *Hepatology.* 2005;52(6):1383-7.
  122. Takamizawa S, Okamoto S, Bishop W, Wen J, Kimura K, Sandler A. Differential apoptosis gene expression in pediatric tumors of the kidney. *J Ped Surg.* 2000;35(2):390-5.
  123. Suita A, Kinoshita Y, Tajiri T, Hara T, Tsuneyoshi M, Mizote H, et al. Clinical characteristics and outcome of Wilms tumors with a favorable histology in Japan: a report from the Study Group for pediatric Solid Malignant Tumors in the Kyushu area, Japan. *J Ped Surg.* 2006;41(9):1501-5.
  124. Metzger ML, Dome JS. Current therapy for Wilms' tumor. *Oncologist.* 2005;10(10):815-28.
  125. Irion LCD, Prolla JC, Hartmann AA, Silva VD. A determinação quantitativa da área de microvasos intratumorais pode ser um indicador útil para tratamento coadjuvante em



- carcinomas de células não pequenas operados do pulmão. *Rev Port Pneumol.* 2003;9(1):19-32.
126. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 2003;13(2): 159-67.
127. Van Hoef ME, Knox WF, Dhesi SS, Howell A, Schor AM. Assessment of tumour vascularity as a prognostic factor in lymph node negative invasive breast cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A:1141-5.
128. Protopapa E, Delides GS, Revesz L. Vascular density and the response of breast cancer to mastectomy and adjuvant chemotherapy. *Eur J Cancer* 1993; 29A:1391-3.
129. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36(2):169-80.

## **ANEXOS**

## **Anexo A**

### **Termo de Compromisso para Utilização de Dados em Prontuários de Pacientes e Bases de Dados em Projetos de Pesquisa**

Título do Projeto:

**"Correlação entre Angiogênese e aspectos clínico-patológicos em Tumor de Wilms"**

Cadastro no Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS: \_\_\_\_\_

Os autores do presente projeto de pesquisa se comprometem a manter o sigilo dos dados de identificação coletados em prontuários e bases de dados referentes a pacientes atendidos no Hospital São Lucas da PUCRS e Hospital Criança Conceição. As informações serão utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica, preservando-se integralmente o anonimato dos pacientes.

Porto Alegre, 2006

Autora do Projeto:

Elinês Oliva Maciel \_\_\_\_\_

## Anexo B

### PROTOCOLO DE TUMOR WILMS

Nome:..... Reg: ..... Hosp:.....  
Cor: B( ) P( ) Am( ) Outro ( )..... Sexo : M( ) F( ) Cirurgião :.....  
Data do nascimento:..... Data do diagnóstico: ..... Data da cirurgia:.....  
Data de recidiva:..... Data da alta:..... Data do óbito:.....

#### HISTÓRIA E EXAME FÍSICO:

Queixa principal:..... Tempo de evolução:.....  
Sintomas: Dor ( ) Vômitos ( ) Febre ( ) Massa abdominal ( ) Perda de peso ( ) Hematúria( )  
Exame físico: BEG( ) REG ( ) MEG ( ) Peso:.....kg  
Hipertensão arterial: Sim ( ) Não ( ) Sistólica:..... Diastólica :.....  
Ausculta torácica alterada : Sim ( ) Não ( ) Qual alteração: .....  
Abdome: plano ( ) flácido ( ) distendido ( ) abaulamento ( ) Local:.....  
Massa palpável: Sim ( ) Não ( ) Local:.....  
lisa ( ) nodular ( ) cística ( ) sólida ( ) ultrapassa a linha média : Sim ( ) Não ( )  
Outros sinais e sintomas:.....  
Diagnóstico de metástases: Sim ( ) Não ( ) Onde?.....  
ao mesmo tempo do diagnóstico ( ) durante quimioterapia ( ) após término quimioterapia ( ) após  
radioterapia ( ) após alta..... meses/anos  
Diagnóstico de recidiva local do tumor: Sim ( ) Não ( ) durante quimioterapia ( )  
após término quimioterapia ( ) após radioterapia ( ) após alta..... meses/anos

#### EXAMES COMPLEMENTARES ADMISSIONAIS

Hb:.....HT:..... Leuc. Totais :..... Neutrófilos:..... Linf:.....  
Plaquetas:..... E.Q.U: Normal ( ) Leucocitúria ( ) Hematúria ( ) Bacteriúria ( )  
Uréia:..... Creatinina:..... Ferritina:..... TGO:..... TGP:..... Bilirub.  
Totais:..... Direta:..... Indireta:..... Fosfatase alcalina:.....

**Rx Simples de abdome:** Sim ( ) Não ( ) massa renal direita ( ) massa renal esquerda ( ) massa bilateral ( )  
calcificações ( ) microcalcificações ( ) casca de ovo ( ) outros achados:.....

**Rx Simples de toráx:** normal ( ) BCP ( ) derrame pleural ( ) d ( ) e ( ) alargamento de mediastino ( ) metástases  
pulmonares ( ) d ( ) e ( ) central ( ) periférico ( ) Outro local:.....

**Ecografia abdominal:** Sim ( ) Não ( ) massa renal direita ( ) massa renal esquerda ( ) massa bilateral ( )  
achados:.....

**Cintilografia óssea:** Sim ( ) Não ( ) achados:.....

**Tomografia computadorizada:** Sim ( ) Não ( ) achados :.....

**Cintilografia renal DMSA** rim D:..... rim E:..... Obs:.....

**TRATAMENTO PROPOSTO**

**CIRURGIA:** primária ( ) pós-quimioterapia ( ) second-look ( )

**QUIMIOTERAPIA PRÉ-OPERATÓRIA:** n° de ciclos:..... drogas utilizadas:.....

**REDUÇÃO TUMORAL:** Sim ( ) Não ( )

**PROTOCOLO TERAPÊUTICO ADOTADO**

Quimioterapia: Sim ( ) Não ( ) actinomicina D ( ) vincristina ( ) adriamicina ( ) ifosfamida ( ) etoposide ( )  
carboplastina ( ) Outros:.....

Radioterapia: Sim ( ) Não ( ) Encaminhado ao serviço:.....

**OUTROS EXAMES INVASIVOS**

**Biópsia por agulha:** Sim ( ) Não ( ) com ecografia ( ) n° de punções :..... n° de fragmentos:.....

**Biópsia por laparotomia:** Sim ( ) Não ( ) impressão diagnóstica:.....

**Líquido de ascite :** Sim ( ) Não ( ) Positivo para cél. Malignas ( )

**Líquido pleural:** Sim ( ) Não ( ) Positivo para cél. Malignas ( )

**DIAGNÓSTICO ANATOMO-PATOLÓGICO:**

WILMS: histologia favorável ( ) anaplasia focal ( ) anaplasia difusa ( ) nefroma mesoblástico ( ) outro ( )

DESCRIÇÃO.....

**ACHADOS CIRÚRGICOS**

Peso do tumor:..... Tamanho do tumor:.....

Tumor confinado ao órgão de origem : Sim ( ) Não ( ) Encapsulado: Sim ( ) Não ( )

Tumor residual : Sim ( ) Não ( )

Ruptura do tumor: Sim ( ) Não ( ) pré-operatório: Sim ( ) Não ( ) trans-operatório: Sim ( ) Não ( )

Necrose tumoral : Sim ( ) Não ( ) Todo tumor ( )

Comprometimento dos linfonodos: Sim ( ) Não ( ) ipsilateral ( ) contra-lateral ( )

Ressecção de órgãos adjacentes: Sim ( ) Não ( ) Qual:.....

Trombo tumoral em: veia cava ( ) veia renal ( ) atrial ( )

Invasão ureteral : Sim ( ) Não ( ) direito ( ) esquerdo ( )

Metástases: Sim ( ) Não ( ) Local:.....

Rim contra-lateral envolvido: Sim ( ) Não ( ) achados:.....

Outros achados.....

**ESTADIAMENTO APÓS CIRURGIA:**

I ( ) II ( ) III ( ) IV ( ) V ( )



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO**  
**CEP - GHC**  
**RESOLUÇÃO**

Porto Alegre, 13 de dezembro de 2006.

O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-GHC, em reunião ordinária em 13/12/2006 analisou o projeto de pesquisa:

**Nº CEP/GHC: 157/06**  
**FR: 112520**

**Título Projeto:** Análise de expressão imunohistoquímica do fator tecidual no tumor de Wilms e sua relação com angiogênese e aspectos clínico-patológicos.

**Pesquisador (es):** Elines Oliva Maciel

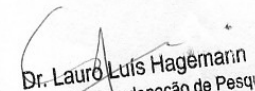
**PARECER:**

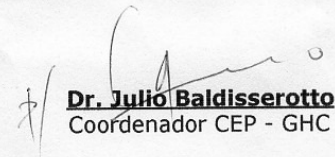
**Documentação:** Aprovada  
**Aspectos Metodológicos:** Aprovados  
**Aspectos Éticos:** Aprovados

**Parecer final:** Este projeto, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de **APROVADO**, neste CEP.

**Grupo e área temática:** Projeto pertencente ao Grupo I – Área Temática (Ciências da Saúde – Medicina – 4.01)

**Considerações finais:** Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/GHC. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do CEP/GHC. O autor deverá encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do projeto. Após conclusão do trabalho, o pesquisador deverá encaminhar relatório final ao Centro de Resultados onde foi desenvolvida a pesquisa e ao Comitê de Ética em Pesquisa.

  
**Dr. Lauro Luis Hagemann**  
Assistente de Coordenação de Pesquisa  
Gerência de Ensino e Pesquisa  
GEP/GHC

  
**Dr. Julio Baldisserotto**  
Coordenador CEP - GHC

**Comitê de Ética em Pesquisa – CEP / GHC** fone/fax: (51) 33572407 – e-mail: pesquisas-gep.com.br  
**Reconhecido:** Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (31/out/1997) – Ministério da Saúde  
IRB – Institutional Review Board pelo U.S. Department of Health and Human Services (DHHS)  
Office for Human Research Protections (ORPH) sob número – IRB 00001105  
FWA Federalwide Assurance sob número FWA 00000378

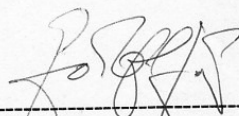
ANEXO D

Porto Alegre, 06 de setembro de 2006.

Ao  
Comitê de Ética em Pesquisa do HNSC

Eu, João Carlos Ketzer de Souza, chefe da Cirurgia Pediátrica do Hospital da Criança Conceição, conheço o Protocolo de Pesquisa intitulado "Análise da Expressão Imuno-histoquímica do Fator Tecidual no Tumor de Wilms e sua relação com Angiogênese e Aspecto Clínico-patológicos" desenvolvido por Elinês Oliva Maciel.

Esta pesquisa utilizará prontuários médicos e análises imuno-histoquímicas em peças fixadas em formalina e será desenvolvida no Instituto de Pesquisa Biomédicas da PUCRS e o início desta pesquisa poderá ocorrer a partir da apresentação da carta de aprovação do comitê de Ética e Pesquisa.



JOÃO C. KETZER DE SOUZA  
CIRURGIÃO  
ASSISTENTE DE GERÊNCIA - HCC

---

João Carlos Ketzer de Souza  
Chefe da Cirurgia Pediátrica HCC

ANEXO E



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 490/05-CEP

Porto Alegre, 13 de junho de 2005.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou protocolo de pesquisa intitulado: "Análise da expressão imunohistoquímica do fator tecidual no tumor de Wilms e sua relação com angiogênese e aspectos clínico- patológicos".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Délio José Kipper  
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)  
Dout Elinês Oliva Maciel  
N/Universidade



ANEXO F

**Anexo – Banco de Dados**

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Rim	Recidiva Tumoral	Óbito	Estágio	Patologia	Pq	Tipo	Risco	Fator Tecidual				DMV	Seguimento (anos)
											Total	Blastema	Epitelial	Estroma		
1	M	4,0	E	N	N	3	F	S	Blastematoso	Alto	1	2	2	1	93,7	8,2
2	F	4,0	D	N	N	1	F	S	Blastema bp	Intermediário	1	2	1	1	42,1	11,8
3	M	4,6	D	N	N	2	F	S	Misto	Intermediário	4	4	3	1	47,5	12,3
4	M	1,0	D	N	N	3	F	S	Regressivo	Intermediário	3		3	1	66,7	7,3
5	M	0,6	E	N	N	1	F	S	Epitelial	Intermediário	2		2	1	138,9	10,8
6	F	3,0	E	N	N	2	F	S	Regressivo	Intermediário	2	2	2	2	22,3	6,8
7	F	6,0	E	N	N	2	F	S	Necrose total	Baixo	2	2		1	2,2	11,2
8	M	3,0	D	S	S	3	F	S	Blastema bp	Intermediário	3	3			16,9	1,2
9	M	2,5	E	S	S	3	F	S	Regressivo	Intermediário	3	3	2	3	63,3	3,7
10	M	4,0	E	N	N	1	F	S	Anaplásico bp	Intermediário	3		4	1	80,6	10,5
11	F	4,0	D	N	N	1	F	S	Misto	Intermediário	1	1	2	1	88,8	11,8
12	F	1,3	E	S	S	2	F	S	Misto	Intermediário	3	3	2	1	54,6	2,5
13	M	2,0	E	N	N	1	F	S	Blastematoso	Alto	2	2	2	1	100,9	4,0
14	F	2,6	BL	S	S	2	F	S	Regressivo	Intermediário	3	3	3	1	31,0	0,3
15	M	0,5	E	N	N	2	F	S	Regressivo	Intermediário	1	1		1	40,8	9,3

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Rim	Recidiva Tumoral	Óbito	Estágio	Patologia	Pq	Tipo	Risco	Fator Tecidual				DMV	Seguimento (anos)
											Total	Blastema	Epitelial	Estroma		
16	M	2,9	E	S	S	2	F	S	Misto	Intermediário	3	2	1	4	8,7	2,0
17	F	2,6	D	S	S	2	F	S	Blastematoso	Alto	3	3	1	1	11,8	0,7
18	M	1,0	E	N	N	2	F	S	Blastema bp	Intermediário	2	3		1	71,5	4,4
19	M	3,0	E	S	S	3	F	S	Blastematoso	Alto	3	3		1	26,5	0,0
20	M	4,9	E	S	S	4	F	S	Blastematoso	Alto	2	2	2	1	35,3	1,3
21	F	1,3	E	S	S	2	F	S	Epitelial	Intermediário	1		1	1	73,2	3,0
22	M	2,0	E	N	N	1	F	S	Misto	Intermediário	3	3	4	1	53,0	4,0
23	M	1,0	BL	N	N	2	F	S	Regressivo	Intermediário	1	2		1	64,9	4,4
24	F	2,6	D	N	N	2	F	S	Blastema bp	Intermediário	2	2	2	1	4,2	4,2
25	F	0,3	D	N	N	2	F	N	Regressivo	Intermediário	2	2	2	1	80,9	5,9
26	F	2,8	D	S	N	3	F	S	Regressivo	Intermediário	2	2	3	1	111,9	5,8
27	F	1,8	E	N	N	3	F	S	Blastematoso	Alto	2	2	2	1	20,2	4,7
28	F	2,5	D	S	S	4	D	N	Blastematoso	Alto	3	3		1	39,9	0,1
29	F	1,3	D	S	S	3	D	S	Regressivo	Intermediário	3	3	1	1	30,5	2,0
30	F	6,9	D	S	S	3	D	S	Blastematoso	Alto	4	3	4	2	26,6	1,1

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Rim	Recidiva Tumoral	Óbito	Estágio	Patologia	Pq	Tipo	Risco	Fator Tecidual				DMV	Seguimento (anos)
											Total	Blastema	Epitelial	Estroma		
31	F	6,0	E	N	N	2	F	N	Blastematoso	Alto	3	3		1	176,4	11,1
32	M	3,0	D	S	S	3	F	S	Regressivo	Intermediário	2	2		1	28,5	0,8
33	F	2,3	D	N	N	2	F	S	Regressivo	Intermediário	2	2	4	2	94,6	4,3
34	M	3,9	D	N	N	3	F	N	Epitelial	Intermediário	3	2	4	1	80,0	8,0
35	M	2,0	E	S	N	4	F	S	Blastematoso	Alto	2	2	3	1	26,3	5,8
36	F	4,6	D	N	N	2	F	N	Misto	Intermediário	1	1	1	1	36,0	5,5
37	F	0,7	E	N	N	1	F	S	Blastematoso	Alto	4	4		1	55,7	5,1
38	F	4,3	E	S	N	4	F	S	Regressivo	Intermediário	3	1	4	1	28,0	4,5
39	F	7,3	D	S	N	1	F	N	Anaplásico bp	Intermediário	3		4	2	53,7	3,7
40	F	7,0	E	N	N	2	F	S	Regressivo	Intermediário	1	1	2	1	46,4	3,6
41	F	2,0	E	S	S	3	F	N	Regressivo	Intermediário	3	3	3	1	157,0	1,3

**Legenda:**

**Sexo:** F: feminino, M: masculino; **Rim:** D: direito, E: esquerdo, BL: bilateral; **Recidiva Tumoral, óbito, Pq (cirurgia pós-quimioterapia):** S: sim, N: não; **Tipo e Risco (SIOP-9); Patologia (NWTS):** F: favorável, D: desfavorável; **Fator Tecidual:** 1: 0% a 25%, 2: 26% a 50%, 3: 51% a 75% e 4: 76% ou mais; **DMV:** Densidade microvascular