

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Medicina

Área de concentração em Cirurgia

**A EXPRESSÃO DO FATOR TECIDUAL NO ADENOCARCINOMA
COLO-RETAL: RELAÇÃO COM ANGIOGÊNESE E
ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS**

Autor: Lúcio Sarubbi Fillmann

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Duval da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Franco Carvalhal

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina da PUCRS, área de concentração em cirurgia, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, maio de 2006

F487e **Fillmann, Lúcio Sarubbi**

A expressão do fator tecidual no adenocarcinoma colo-retal: relação com angiogênese e aspectos clínico-patológicos / Lúcio Sarubbi Fillmann; orient. Vinícius Duval da Silva; co-orient. Gustavo Franco Carvalho. Porto Alegre: PUCRS, 2006.

79f.: il. gráf. 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: Clínica Cirúrgica.

1. IMUNOHISTOQUÍMICA. 2. TROMBOPLASTINA. 3. SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA. 4. NEOVASCULARIZAÇÃO PATOLÓGICA. 5. ANGIOGÊNESE. 6. NEOPLASIAS COLORRETAIS/cirurgia. 7. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Silva, Vinícius Duval da. II. Carvalho, Gustavo Franco. III. Título.

C.D.D. 616.99435

C.D.U. 616.35-006.6:577.21(043.2)

N.L.M. W1 529

Aos meus pais, Érico e Consuelo, por terem proporcionado, ao longo de minha vida, as condições para realização de meus sonhos.

A minha esposa e filhas, Cláudia, Laura e Gabriela, pelo apoio e carinho nesta minha jornada científica.

A meu irmão e colega de trabalho, Henrique, pelo exemplo de médico e pesquisador.

Agradecimentos

- Ao Dr. Vinicius Duval da Silva, que tive o prazer de conhecer por ocasião do início deste projeto e que se revelou um pesquisador exemplar, um incentivador nos momentos de dificuldade e um grande amigo.
- Ao Dr. Gustavo Franco Carvalhal, meu amigo de longa data, pelas inestimáveis sugestões, críticas e incentivo ao longo da execução deste projeto.
- Ao Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS, pela ajuda na obtenção do material de pesquisa.
- À Dra Ana Maria Geiger pelo auxílio em decifrar os enigmas da imunistoquímica.
- Aos colegas de pesquisa em angiogênese, Dr. Marcelo Toneto, Dr. Eurico Dornelles Neto, e Dra. Elinês Maciel pelo auxílio e companheirismo diante das dificuldades encontradas na realização deste projeto.
- À Faculdade de Medicina da PUCRS pelo apoio ao meu desenvolvimento profissional através do incentivo à realização deste projeto.
- Aos meus colegas de serviço, Dr Érico Fillmann e Dr Henrique Fillmann, pelo incentivo e companheirismo durante meus longos períodos de ausência de minhas atividades rotineiras.

Índice

Resumo	7
Abstract	8
Introdução	
Epidemiologia do câncer colo-retal.....	9
Avaliação clínica e anátomo-patológica dos tumores colo-retais: dados relevantes para o prognóstico.....	11
Angiogênese tumoral: fisiopatologia e importância clínico-patológica.....	17
Fator tecidual: funções fisiológicas e importância no desenvolvimento de neoplasias malignas.....	26
Objetivos	38
Pacientes e métodos	
Seleção dos pacientes e dos materiais utilizados.....	39
Análise da expressão do fator tecidual.....	40
Quantificação da densidade microvascular.....	42
Técnica de imunistoquímica.....	44
Análise estatística.....	44
Aspectos bioéticos da pesquisa.....	45
Resultados	
Características da amostra estudada.....	46
Expressão do fator tecidual.....	48
Relação entre a expressão do fator tecidual e a densidade microvascular.....	49
Relação entre a intensidade da expressão do fator tecidual e fatores clínicos e anátomo-	

patológicos na amostra.....	50
Discussão.....	54
Perspectivas de novos estudos envolvendo o fator tecidual e o câncer colo-retal.....	60
Conclusão.....	63
Lista de abreviaturas.....	64
Bibliografia.....	65

Resumo:

A importância da interação entre o mecanismo de coagulação e o câncer é reconhecida desde as descrições pioneiras de Trousseau. Mais recentemente, estudos demonstraram a importância do fator tecidual, uma proteína de membrana celular ligada ao desencadeamento da cascata da coagulação, na progressão de neoplasias malignas através da estimulação do processo de angiogênese. Realizamos marcação imunoistoquímica para o fator tecidual em 43 adenocarcinomas colo-retais de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico no Serviço de Coloproctologia do HSL-PUCRS e comparamos a intensidade da sua expressão com a densidade microvascular, critérios de estadiamento, idade, sexo e sobrevida geral. Oitenta e três por cento dos tumores apresentaram alta expressão do fator tecidual, havendo uma relação estatisticamente significativa entre esta e a maior densidade microvascular ($p=0,02$). Observamos também que os pacientes com alta expressão do fator tecidual apresentavam uma média de idade significativamente maior do que a dos pacientes com baixa expressão desta proteína ($p<0,01$). Em conclusão, a elevada intensidade de marcação imunoistoquímica para o fator tecidual se relacionou com uma média de densidade microvascular mais elevada e com pacientes mais idosos quando comparados aos casos com baixa expressão desta proteína.

Abstract:

Several reports recognize the interaction between malignant cell growth and coagulation pathway. Recently, some studies suggested that tissue factor, a primary initiator of coagulation, is expressed in a variety of solid tumors in association with increased angiogenesis. We analyzed tissue factor expression in 43 colorectal carcinomas of patients treated by surgery at our institution, comparing the results with microvascular density, pathologic staging, gender, age, and overall survival. Tissue factor was intensely expressed in 88,3% of the tumors and its expression was positively associated with increased microvascular density ($p=0.02$). Patients with intense expression of tissue factor were significantly older than the ones with lower expression of this protein ($p<0.01$). In conclusion, the high intensity of tissue factor expression in colorectal carcinoma correlates with tumoral angiogenesis and appears to be present in older patients.

Introdução

Epidemiologia do câncer colo-retal.

O adenocarcinoma colo-retal é uma das neoplasias malignas mais incidentes no ser humano (1,2,3). No mundo inteiro, são esperados mais de 570.000 novos casos a cada ano (2). Mais prevalente em países do hemisfério norte, esta doença representa uma importante questão de saúde pública em nações desenvolvidas (1).

No Brasil, com o aumento da expectativa de vida associado à progressiva industrialização, observamos que os tumores malignos, de uma maneira geral, crescem em importância, ocupando, progressivamente, posições mais altas no perfil epidemiológico de incidência e de mortalidade geral da população (1). Este é o caso do câncer de intestino grosso e reto. Entre os brasileiros, os carcinomas colo-retais estão entre as cinco neoplasias malignas mais frequentes (2). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) (4), os números projetados para o ano de 2006 apontam uma taxa de incidência de 12 novos casos/100.000 indivíduos/ano entre homens e de 15 novos casos/100.000 indivíduos/ano entre mulheres. No Rio Grande do Sul, as taxas de incidência projetadas pelo INCA indicam uma incidência significativamente mais elevada, com 27 novos casos/100.000 indivíduos/ano entre homens e 28 novos casos/100.000 indivíduos/ano entre mulheres. Em Porto Alegre estas cifras são ainda mais significativas com 46 novos casos entre homens e 48 novos casos entre mulheres para cada 100.000 indivíduos no ano de 2006. Neves e colaboradores (2), em uma análise dos dados epidemiológicos para o câncer de reto e intestino grosso no período de 1980 a 1997, relataram que as taxas de mortalidade apresentaram importantes diferenças regionais e entre capitais, observando-se índices mais

elevados nas regiões Sul e Sudeste, ainda que a tendência aponte para um aumento destes números em todas as regiões do país. Para os autores, as regiões Sul e Sudeste, em comparação com as demais, apresentam hábitos de vida que poderiam se associar mais facilmente a um risco elevado de desenvolvimento do câncer colo-retal, como o baixo consumo de fibras e o alto teor de lipídios na dieta, ingestão elevada de álcool e maior prevalência de tabagismo(2).

Avaliação clínica e anátomo-patológica dos tumores colo-retais: dados relevantes para o prognóstico.

Inúmeras são as variáveis consideradas na avaliação prognóstica dos adenocarcinomas colo-retais. Tais dados, coletados a partir de informações clínicas ou obtidos após estudo detalhado de espécimes cirúrgicos, são utilizados na definição da indicação de tratamentos complementares e servem como base para uma estimativa das possibilidades de cura da doença.

Diversas séries demonstraram vários fatores que estão associados a um melhor ou pior prognóstico do câncer colo-retal. Philips e colaboradores (5), revisando dados de 2518 pacientes reunidos no Projeto Britânico do Câncer de Intestino Grosso relacionaram quatro variáveis que apresentaram valor preditivo significativo na sobrevida em cinco anos destes pacientes:

- 1) Profundidade da invasão das lesões na parede intestinal: pacientes com lesões limitadas à submucosa demonstraram melhores taxas de sobrevida do que aqueles que apresentavam tumores invadindo a muscular própria do intestino, e estes últimos tinham também sobrevida superior aos casos com invasão transmural da parede intestinal.
- 2) Ocorrência de invasão linfática da cadeia regional do intestino grosso.
- 3) Grau de diferenciação celular do tumor.
- 4) Identificação da invasão de vasos sanguíneos por células neoplásicas.

Os critérios de invasão da parede intestinal e a ocorrência de metástases em linfonodos regionais compõem os aspectos mais relevantes do estadiamento anátomo-patológico do câncer colo-retal (6). São reconhecidos como de importância prognóstica

desde os trabalhos de estadiamento descritos na classificação de Dukes, várias vezes atualizada, bem como na classificação da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* mais recente, a qual utiliza o sistema “*tumor, node, metastases*” (TNM) (6,7). Os carcinomas de cólon e reto são subdivididos, neste último sistema, no que se refere à invasão da parede do intestino, em: lesões limitadas à mucosa (Tis); aqueles com invasão da submucosa (T1); os que atingem a muscular própria (T2); os casos que ultrapassam a muscular própria do intestino e chegam à serosa ou a regiões não peritonizadas peri-intestinais (T3) como no caso do reto; e, por fim, os que invadem estruturas adjacentes (T4). Quanto à presença de metástases linfáticas, os tumores colo-retais se subdividem em: metástases ausentes (N0); de 1 a 3 linfonodos pericólicos ou peri-retais envolvidos (N1); quatro ou mais linfonodos peri-intestinais envolvidos (N2). Da mesma maneira que Philips e colaboradores, diversos autores descreveram a relação entre o estágio da doença e a sobrevida dos pacientes afetados pelo adenocarcinoma do cólon e reto. Lindmark (8), em 212 casos de tumores colo-retais, observou que o estágio clínico-patológico da doença foi a variável mais fortemente relacionada à sobrevida, dentre outras avaliadas. Wiggers (9), revisando dados patológicos de 350 pacientes com câncer de cólon e reto, encontrou uma forte associação entre o estágio anátomo-patológico da doença e a sobrevida em 5 anos. Jessup (10), em uma revisão sobre os fatores prognósticos nos tumores colo-retais, concluiu que os determinantes clínico-patológicos mais significativos no resultado do tratamento destas neoplasias são aqueles vistos no estadiamento patológico, ou seja, o grau de penetração na parede intestinal e a ocorrência de metástases linfáticas. Steinberg (11), em uma relação de 572 tumores colo-retais, considerou que o estágio da doença apresenta grande relação tanto com a sobrevida em 5 anos quanto com a sobrevida livre de neoplasia.

Além do estadiamento anátomo-patológico, diversas características dos tumores foram testadas com relação à sobrevida dos pacientes.

A relação entre a idade dos pacientes e as perspectivas de sucesso do tratamento do câncer colo-retal tem se mostrado, na literatura, um ponto controverso. Wiggers e colaboradores (9), revisando 350 pacientes portadores deste tipo de neoplasia, não encontraram relação entre idade e sobrevida em cinco anos. Arbmam (12), investigando 596 pacientes operados por carcinoma do cólon e reto, também não encontrou relação entre a idade no momento da cirurgia e a sobrevida dos indivíduos analisados. Violi e colaboradores (13), em uma revisão de 1.256 casos de neoplasia de intestino grosso e reto, não observaram relação entre a idade e a sobrevida a longo prazo dos indivíduos submetidos a tratamento cirúrgico. Notaram que o número de óbitos foi maior no grupo de maior idade, mas que tal fato ocorreu devido à maior frequência de patologias concomitantes nas faixas etárias mais elevadas. Por outro lado, Whittle (14) em um estudo dos registros de 5586 pacientes tratados por câncer de cólon, observou que a sobrevida em um ano dos indivíduos acima de 85 anos era de 65% em comparação com 85% para aqueles com idade entre 66 e 69 anos. Na sobrevida em dois anos, os números diminuíam para 50% e 75% respectivamente. A tendência para diminuição da sobrevida com o aumento da idade foi significativa tanto para um ano quanto para dois. Da mesma maneira, Lindmark (8) encontrou, em 212 casos de câncer colo-retal, uma associação entre a idade mais elevada e um pior prognóstico oncológico. A questão não está definida, mas a tendência atual é a de se supor que o prognóstico do câncer colo-retal não é pior para aqueles indivíduos mais idosos (10). Por outro lado, os pacientes abaixo de 40 anos parecem apresentar um maior risco de recorrência da doença, o que pode se dever tanto a um comportamento biológico

mais agressivo dos tumores, quanto a um atraso no início do tratamento na suposição de que os sintomas referidos estejam relacionados a uma doença benigna (10).

No que diz respeito à localização da lesão primária, as evidências científicas acumuladas até o momento mostram um resultado também conflitante entre as experiências dos vários autores. Existem diversos relatos de que o carcinoma do reto apresenta um pior prognóstico oncológico quando comparado aos tumores de cólon (6,10,15). A razão para tal diferença pode se dever tanto a uma maior dificuldade na obtenção de margens mais amplas e confiáveis em função das restritas condições de se intervir cirurgicamente na pelve (10), quanto por um comportamento biológico distinto entre tumores do reto e lesões do cólon (15). Philips e colaboradores, entretanto, não encontraram relação entre a localização primária do tumor e a recorrência mais freqüente da doença em sua numerosa série de pacientes (16). Wiggers (9) e Lindmark (8) também chegaram a essa mesma conclusão, não encontrando diferença significativa nas taxas de recorrência entre tumores de reto e do intestino grosso.

Analisando somente lesões colônicas, Eisenberg (15) demonstrou uma recorrência mais freqüente da doença entre tumores do cólon esquerdo do que do cólon direito. Steinberg (17), no entanto, analisando 572 pacientes com câncer de intestino grosso, concluiu que a localização do tumor era de pouca importância prognóstica, não afetando a sobrevida geral ou a sobrevida livre de doença. Wiggers (9) e Lindmark (8) chegaram a esta mesma conclusão, não observando diferenças significativas quanto à sobrevida entre lesões situadas no cólon esquerdo, direito ou transversal.

Com relação ao grau de diferenciação histológica, a literatura demonstra resultados muito mais uniformes com relação a sua importância prognóstica do que o observado para idade dos pacientes e localização primária do tumor no intestino. O grau de diferenciação

histológica foi relacionado à tendência de invasão linfática, à profundidade da invasão tumoral na parede intestinal, à fixação a estruturas adjacentes e ao número de linfonodos envolvidos (18). Saclarides (19), analisando os dados referentes a 62 pacientes com câncer de reto, demonstrou que o grau de diferenciação celular guardava importante relação com a possibilidade de metástases em linfonodos regionais. Wiggers (9) demonstrou um número significativamente maior de óbitos relacionados à neoplasia naqueles tumores pouco diferenciados em comparação com os de maior grau de diferenciação celular. Lindmark (8) também demonstrou um pior prognóstico relacionado à pouca diferenciação dos tumores colo-retais. Philips (5) e colaboradores colocaram o grau de diferenciação histológica como uma das variáveis com maior influência na sobrevida em cinco anos dos pacientes tratados por carcinoma do cólon e reto.

Outra variável já pesquisada foi a dimensão das lesões colo-retais. O tamanho dos tumores foi muitas vezes relacionado a um melhor ou pior prognóstico tanto para a ressecção quanto para a sobrevida geral dos pacientes (9,18). Steinberg e colaboradores (11) não encontraram relação entre o tamanho dos tumores colo-retais e a sobrevida dos pacientes quando o tamanho tumoral foi analisado como variável única. Entretanto, quando ajustada para outros fatores relacionados à doença, a dimensão dos tumores de cólon e reto se mostrou bastante significativa quanto ao prognóstico das lesões tratadas. Cohen (18) observou que, nos tumores bem diferenciados e moderadamente diferenciados, 42% das lesões com 4 cm ou mais invadiam toda a parede intestinal, em comparação a 12% daquelas com menos de 4 cm. Além disso, 77% dos carcinomas definidos como pouco diferenciados ou colóides e que tinham mais de 4 cm de tamanho invadiam toda a espessura da parede colo-retal. Wiggers (9), por outro lado, observou que lesões de tamanho relativamente grande (3,5 até 6 cm) apresentavam melhor sobrevida do que grupos de tumores maiores

(mais de 6cm) bem como de lesões menores (menos que 3,5 cm). Wolmark (20), revisando dados colhidos de 906 pacientes tratados por câncer colo-retal, não encontrou relação entre o maior diâmetro dos tumores primários e a ocorrência de metástases linfáticas regionais. A tendência atual na literatura especializada é de considerar o tamanho dos carcinomas coloretais como de pouco valor prognóstico (8), principalmente quando esta variável é analisada isoladamente (11).

Por fim, a ocorrência de invasão vascular, principalmente invasão venosa, foi amplamente demonstrada em tumores malignos de cólon e reto (9,19,21,22). Talbot e colaboradores (21) observaram que a ocorrência de metástases hepáticas aumentou significativamente naqueles pacientes com invasão de vasos sanguíneos adjacentes ao tumor primário. O prognóstico foi ainda pior naqueles indivíduos em que a invasão ocorreu em veias localizadas fora do limite da parede intestinal. Minsky e colaboradores (22) também relataram um prognóstico adverso naqueles casos em que foi demonstrado comprometimento dos vasos sanguíneos, principalmente quando a lesão envolvia vasos extramurais. Shirouzu (23) observou um aumento significativo na recorrência local e no surgimento de metástases hepáticas em pacientes que apresentavam invasão vascular peritumoral, demonstrando também uma diminuição importante da sobrevida nestes casos. Wiggers (9) relatou a ocorrência de comprometimento vascular em 93 de 329 tumores de cólon e reto. Destes 93 casos, 48,4% apresentaram óbito relacionado à progressão da doença, em comparação com 23,7% daqueles em que não havia invasão vascular.

Angiogênese tumoral: fisiopatologia e importância clínico-patológica.

A relação dos tumores malignos com o seu suprimento sanguíneo regional vem se revestindo de importância cada vez mais significativa na literatura. Não só a invasão vascular, mas a habilidade que as lesões adquirem de controlar o seu próprio aporte de sangue constitui hoje motivo de atenção e pesquisa, e é o tema deste estudo.

Chamamos angiogênese ao processo de criação de novos vasos sanguíneos. Tal mecanismo é observado fisiologicamente em inúmeras funções e fases de desenvolvimento do organismo. Novos vasos são fundamentais no desenvolvimento dos tecidos normais, no processo de reprodução e crescimento embrionário e na cicatrização de feridas (24). A neovascularização, entretanto, também é um processo associado ao surgimento e ao desenvolvimento de diversas doenças no ser humano. Dentre estas, o câncer tem sua progressão e letalidade associadas à aquisição da habilidade de controlar seu próprio suprimento sanguíneo, viabilizando assim o crescimento ilimitado e descontrolado que caracteriza a doença (24,25).

Folkman (25) foi um dos pioneiros no estudo do controle, por parte das neoplasias malignas, da proliferação de vasos sanguíneos adjacentes à lesão. A constatação de que a frequência de surgimento de tumores *in situ* observados em estudos de autópsia é significativamente maior do que a de tumores malignos francamente invasores, especialmente nas lesões de mama, tireóide e próstata, indica que a ocorrência de disseminação sistêmica é um evento relativamente infrequente (25). A incapacidade de progredir como lesão neoplásica, segundo Folkman, reside no fato de que tumores *in situ* não adquiriram um fenótipo angiogênico que possibilitasse seu crescimento (25).

A teoria de desenvolvimento tumoral de Folkman baseia-se em vários aspectos. Inicialmente, a maioria das lesões apresenta uma fase de aparente inatividade proliferativa

associada a um estágio praticamente avascular (25,26). A nutrição destas células depende principalmente da difusão de nutrientes pelos tecidos adjacentes, o que limita seu tamanho a aproximadamente 1 ou 2 mm (25,26). 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 (25,26). Esta habilidade de gerar suprimento sanguíneo foi creditada à produção, por parte das neoplasias, de um agente bioquímico inicialmente chamado de fator de angiogênese tumoral (26). Logo tornou-se extremamente atraente a possibilidade de se criar uma substância com função bloqueadora do fator angiogênico como forma de tratamento de tumores malignos, reconhecendo-se que tal medida provavelmente reduziria a lesão a um tamanho em que o suprimento sanguíneo não mais seria fundamental para a sobrevivência das células (1 ou 2 mm) (26). O câncer não seria, portanto, erradicado, mas teria uma regressão sustentada enquanto o bloqueio angiogênico fosse mantido (26). Estas hipóteses são a base teórica para o uso terapêutico de drogas bloqueadoras da formação de vasos sanguíneos tumorais.

O primeiro alvo para um ataque bloqueador da angiogênese tumoral foi identificado em 1984 por Shing e colaboradores (27) em amostras de um condrossarcoma, tendo sido chamado fator básico de crescimento do fibroblasto. Apesar de seu uso em modelos experimentais haver resultado no crescimento de capilares sanguíneos, esta substância não parecia ser um agente de importância significativa. Foi com as descrições que se seguiram 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 e alvo de medidas terapêuticas (28).

O VEGF é possivelmente o mais potente agente angiogênico conhecido (29). Sua presença aumenta a permeabilidade vascular e constitui importante estímulo para a mitose de células endoteliais (26,29,30). Em situações de hipóxia, é possível observar um aumento significativo dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para VEGF, bem como da proteína resultante (26,29,30). 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 de hepatócito; o fator beta de crescimento de fibroblastos; e os fatores de crescimento transformadores (TGFs – “*transforming growth factors*”) (30).

Uma vez havendo sido identificadas algumas das fontes do estímulo angiogênico, a próxima descoberta significativa foi a correlação entre o grau de neovascularização tumoral e o prognóstico adverso observado em vários tipos de lesões malignas (26). Neste campo de estudo, os achados pioneiros de Weidner (31) são o ponto de partida para a correlação entre a densidade de microvasos tumorais e o comportamento clínico destas lesões. 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 em microscopia de grande aumento nas áreas de maior concentração vascular, os chamados “*hot-spots*”. Usando esta metodologia, Weidner e colaboradores (31) analisaram dados de 49 pacientes com carcinoma de mama invasor. 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.

Desde então, esta metodologia foi utilizada para avaliar a neovascularização de diversos tipos de lesões neoplásicas, bem como a sua relação com o prognóstico dos pacientes tratados.

É possível encontrar estudos relacionando a densidade microvascular (DMV) com inúmeros tumores de diversos sistemas. Uma revisão neste sentido nos mostra que o significado clínico deste parâmetro de quantificação da angiogênese tumoral apresenta ampla variação quanto a sua importância prognóstica.

Em tumores de cabeça e pescoço, por exemplo, os estudos recentes apresentam resultados conflitantes. Cantu de Leon e colaboradores (32), avaliando 118 pacientes portadores de carcinomas do tipo epidermóide da região cervical, 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. Garcia de la Torre e colaboradores (33), avaliando lesões proliferativas de paratireóide, observaram que a DMV estava aumentada em adenomas, mas que este dado não se relacionava com o comportamento clínico das lesões, utilizando-se como critérios o tamanho dos tumores e níveis séricos de hormônio paratireóide e cálcio. Brieger e colaboradores (34), 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.

Em neoplasias ginecológicas, Nayha e colaboradores (35) 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. Em neoplasias de ovário, por outro lado, Sonmezer e colaboradores (36) não encontraram correlação entre a DMV, a sobrevida ou parâmetros anátomo-patológicos. Os níveis de VEGF também não se mostraram de importância significativa, ocorrendo correlação estatística somente com o volume de ascite. Não se observou também relação entre a intensidade de marcação imuno-histoquímica para VEGF e a DMV nestes tumores.

No trato gastrointestinal, temos diversos estudos demonstrando a importância prognóstica da DMV em tumores de esôfago, estômago, fígado, pâncreas e cólon. Tais estudos trazem dados comparativos de especial interesse para nossa linha de pesquisa.

Em carcinomas de esôfago, Du e colaboradores (37) observaram que 81,36% das lesões expressavam VEGF, resultando em índices aumentados de densidade microvascular. Tais dados demonstraram relação significativa com o grau de diferenciação tumoral e metástases linfáticas, não tendo sido observada importância significativa na profundidade de penetração na parede intestinal. Nakagawa e colaboradores (38), analisando dados de 103 esofagectomias por carcinoma epidermóide do esôfago, observaram que a DMV guardava relação com a profundidade de penetração do tumor na parede do órgão, ocorrência de metástases intramurais, índices elevados de recorrência pós-operatória e pior sobrevida geral.

Em adenocarcinomas gástricos, Chung e colaboradores (24) avaliaram a relação entre a intensidade da expressão do VEGF, a DMV, a sobrevida geral e os índices de recorrência metastática em indivíduos submetidos a tratamento cirúrgico com intenção curativa. Os autores relataram que a DMV foi significativamente mais alta em lesões VEGF positivas, sendo que tais pacientes tiveram um índice de 66,7% de recorrência hepática,

comparados a 16,7% naqueles com VEGF negativo. Du e colaboradores (37) observaram que 67,5% dos adenocarcinomas de estômago expressavam VEGF, sendo a contagem microvascular nestas lesões maior do que a encontrada em patologias benignas. Na avaliação destes autores, a DMV foi significativamente maior em tumores avançados quando comparados a lesões precoces. Ichinoe e colaboradores (39), comparando adenocarcinomas gástricos precoces de padrão de crescimento superficial ou infiltrativo, encontraram uma forte relação entre a DMV, a expressão de VEGF, de óxido nítrico sintetase e ciclo-oxigenase-2 neste último tipo de tumor, enquanto que as lesões de crescimento superficial apresentavam fraco padrão de neovascularização. Por fim, Tsujitani e colaboradores (40) relataram que a DMV, o tamanho dos tumores e a presença de metástases linfáticas foram fatores preditivos independentes do prognóstico de adenocarcinomas de estômago, sendo que a densidade de microvasos foi maior naqueles casos em que o VEGF estava significativamente expresso.

Nas neoplasias pancreáticas, Tan e colaboradores (41) demonstraram que tumores neuroendócrinos não apresentavam comportamento desfavorável mesmo com contagem elevada de microvasos. Por outro lado, diversos estudos observaram um melhor prognóstico para adenocarcinomas do pâncreas que se mostravam hipovascularizados (41).

Em hepatocarcinomas, Yao e colaboradores (42) observaram dados prognósticos significativos com relação à DMV. Em 90,9% dos casos metastáticos, os tumores expressavam VEGF, contra 63,9% das lesões localizadas. A contagem de microvasos acompanhou a taxa de expressão do VEGF, sendo ambas maiores nas lesões não encapsuladas, pouco diferenciadas e metastáticas. 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.

No câncer colo-retal, objeto de nosso estudo, a análise do significado clínico da contagem microvascular apresenta resultados conflitantes. Em 1994, Saclarides e colaboradores (43) relataram uma casuística de 48 indivíduos portadores de adenocarcinoma do reto em que a DMV aumentada foi relacionada a estágios anátomo-patológicos mais avançados, maior tamanho dos tumores e maior recorrência metastática. Em 1995, o mesmo autor em conjunto com Frank e colaboradores (44), descreveu resultados significativos em relação à menor sobrevida em cinco anos em 105 pacientes tratados por carcinomas de cólon no estágio B2 de Astler-Coller que apresentavam escores elevados de DMV. Chung e colaboradores (24) observaram uma associação direta entre a expressão de VEGF e os níveis elevados de contagem de microvasos em carcinomas colo-retais. A estes achados foram somadas evidências apontando para uma correlação entre a DMV e a ocorrência de metástases por via hematogênica. Tanigawa e colaboradores (45), 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. Kaio e colaboradores (46) relacionaram a elevada intensidade da expressão de agentes angiogênicos na extremidade mais profunda de invasão de adenocarcinomas colo-retais com índices elevados de DMV. Tal associação mostrou resultados significativos quanto ao risco de metástases hematogênicas e menor sobrevida global dos pacientes. Por fim, Tarta (47) 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.

Nem todos os pesquisadores que analisaram a importância da contagem microvascular no adenocarcinoma colo-retal chegaram a estas mesmas conclusões. Banner e colaboradores (48), estudando 22 pacientes com carcinomas do cólon e reto com invasão transmural da parede intestinal e sem metástases linfáticas, relataram que aqueles indivíduos com sobrevida mais longa apresentavam índices de DMV maiores quando comparados aos casos de recorrência precoce da neoplasia. Lindmark (49) 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 colaboradores (50) 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 colaboradores (51) também 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 colaboradores (52), 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 à 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.

Frente a estes achados conflitantes na literatura, o estudo de outros fatores associados à angiogênese tumoral além da simples contagem dos vasos parece fundamental para que possamos compreender melhor a biologia das lesões e para expandirmos o nosso arsenal terapêutico oncológico.

Fator tecidual: funções fisiológicas e importância no desenvolvimento de neoplasias malignas.

Estudos pioneiros, datando do final do século XIX, demonstraram que o mecanismo de coagulação sanguínea resulta da interação entre protrombina, cálcio, fibrinogênio e um quarto fator conhecido como tromboplastina ou, mais frequentemente, fator tecidual (FT) (53).

O FT desempenha uma função fundamental na cascata de coagulação sanguínea ao combinar-se com o fator VII, complexo este que tem ação proteolítica, resultando então na ativação dos fatores IX e X, desencadeando a sequência de reações que terminam por converter fibrinogênio em fibrina, levando à formação final de um coágulo (53,54,55).

Em sua forma madura, o FT, uma proteína trans-membrana, apresenta 219 aminoácidos em sua porção extracelular, 23 aminoácidos na cadeia trans-membrana e 21 na sua porção citoplasmática (53). 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 (53).

Usualmente, o FT está presente nos fibroblastos da adventícia de vasos sanguíneos, cápsulas de órgãos, células epiteliais de pele e mucosas, células do estroma endometrial e astrócitos no sistema nervoso central (53). Não foi detectada a presença de fator tecidual em células intravasculares, como o endotélio normal, sugerindo que ele constitui um envelope hemostático no caso de ruptura da integridade vascular ou tecidual (53).

Acredita-se também que o FT apresente efeitos morfogênicos, por exemplo, sobre células de músculo liso (53). Na placa aterosclerótica, estudos demonstraram que ele é expresso em macrófagos e na muscular do vaso (53). Toshi e colaboradores (56) demonstraram que o FT está presente nas placas ateroscleróticas ricas em lipídios e

sugeriram que ele representa um forte estímulo trombogênico sobre estas lesões ateromatosas, principalmente após a ruptura espontânea da placa. Por outro lado, após lesão mecânica arterial, como visto na angioplastia ou dilatação com balão, ocorre a migração de células de músculo liso que participam da reparação do trauma. Este efeito benéfico, mediado em parte pelo fator tecidual, representa uma contrapartida vantajosa ao risco de trombose associado à exposição do FT a proteínas plasmáticas relacionadas à coagulação. De fato, estudos demonstraram que a neutralização do complexo FT/Fator VII ativado (FT/FVIIa) resulta em diminuição da espessura da íntima arterial (57).

Também foi identificada a expressão do fator tecidual em diversas células de tecidos embrionários como epitélios, cardiomiócitos, células do endoderma visceral, 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 (53). Mais recentemente, estudos com inativação de genes revelaram que a deficiência do FT é letal para embriões em função de um desenvolvimento vascular comprometido (53, 58).

Além do período embrionário, outras circunstâncias podem induzir a expressão do FT. Citocinas inflamatórias (como o fator de necrose tumoral), mitógenos (como o VEGF, insulina e o fator de crescimento de fibroblastos), hormônios, endotoxinas, infecções virais, hipóxia e trauma mecânico foram também associados a um aumento de atividade desta proteína (53).

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 (53,59). Recentemente, 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 (53,59). Esta associação entre a expressão do FT e o desenvolvimento de neoplasias malignas é o foco central de nossa pesquisa.

A relação entre os mecanismos de coagulação e o desenvolvimento do câncer é reconhecida desde longa data. Em 1865, Armand Trousseau (59) observou que pacientes que se apresentavam com trombo-embolismo sintomático freqüentemente eram também portadores de uma neoplasia maligna oculta. Ele também notou que indivíduos reconhecidamente portadores de um tumor maligno apresentavam uma tendência aumentada para fenômenos de natureza trombo-embólica. Levantamentos estatísticos 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, incidência esta que chega a 18% nos estágios III e IV (60). No plano inverso, indivíduos com trombo-embolismo sem uma condição clínica aparente e detectável apresentam um risco significativamente aumentado, podendo chegar até a nove vezes o observado na população em geral, de terem diagnosticada uma neoplasia maligna nos seis meses a um ano subseqüentes (61). Esta chance é ainda maior se um segundo episódio de trombose ocorrer (61).

Um dos agentes associados aos estados de hipercoagulabilidade relacionados aos tumores malignos é o fator tecidual (FT) (59,62). Sua expressão encontra-se aumentada em neoplasias como as de pequenas células de pulmão (63), os gliomas (64), e os carcinomas de mama (65), pâncreas (66), cólon (67) e próstata (68), sendo também relacionada com estágios avançados destas doenças.

Vários autores indicaram que o FT desempenha um papel crucial na fisiopatologia do câncer devido à capacidade de estimular a expressão genética do VEGF e, através dele, criar uma proliferação vascular tumoral exagerada, fundamental para o desenvolvimento do tumor e sua habilidade de produzir metástases (59,67,69,70). A alteração na homeostase angiogênica requer um desequilíbrio no balanço de fatores pró-angiogênese e anti-angiogênese que normalmente manteriam a proliferação de células endoteliais sob controle (59). O FT parece interferir neste equilíbrio através de um estímulo à expressão do VEGF (59,71) e também na supressão da trombospondina, um peptídeo anti-angiogênico (59). Além disto, tanto o FT quanto o VEGF têm expressão aumentada na hipóxia, fenômeno frequentemente observado no câncer (72). Aparentemente, duas vias fisiopatológicas existem para explicar o estímulo angiogênico do FT (59). Uma delas é dependente do mecanismo de coagulação (59,73) e a outra não (59).

No primeiro caso, a rota angiogênica dependente de coagulação resulta da ativação da trombina via ligação do FT ao fator de coagulação VII. A presença de trombina resulta em lise dos fibrinopéptídeos A e B a partir da molécula do fibrinogênio, que determina a conversão deste em fibrina. Níveis plasmáticos elevados de fibrinopeptídeo A foram relacionados com crescimento tumoral (59). 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 (59,73,74). Esta matriz serve como base para migração de células endoteliais e para a angiogênese justatumoral. 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 (59,73,74).

Existem também evidências de que 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 (59). A fosforilação da porção citoplasmática do FT induz a formação de uma seqüência de sinais intracelulares que resultam na transcrição de vários genes (59,70,74,75). O fator de crescimento vascular endotelial tem sua transcrição aumentada pela ativação do FT, levando a um potente estímulo angiogênico (59,70,74,75). Por outro lado, a trombospondina é inibida pelo FT, reduzindo a sua capacidade anti-angiogênica (59). Além disto, como vimos anteriormente, o aumento da atividade do VEGF por ação do FT resulta em uma permeabilidade vascular exagerada a proteínas plasmáticas, com deposição de fibrina na forma de uma matriz junto às células tumorais (59). Tal matriz representa também um estímulo a proliferação de vasos sanguíneos uma vez que sua análise demonstrou altas concentrações de agentes pró-angiogênicos como o fator de crescimento de fibroblastos, o próprio VEGF e o fator de crescimento associado à insulina tipo 1 (IGF-1) (59). 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 retroalimentação positiva através de um novo incremento na transcrição do VEGF (59).

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. Hembrough e colaboradores (76), 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. Por outro lado, 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.

Rickles e colaboradores (77) observaram uma forte correlação entre a expressão de FT e a síntese de VEGF em linhagens tumorais humanas. A inoculação destas células neoplásicas em camundongos imunossuprimidos levou ao desenvolvimento de tumores com alta taxa de densidade microvascular. Ao se transfectar em uma linhagem tumoral com baixa expressão de FT/VEGF uma seqüência codificante completa do FT, 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 colaboradores (78) 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. Por outro lado, melanomas com baixa expressão destes dois elementos produziam tumores relativamente avasculares. A inoculação de uma seqüência de DNA para o FT que produzisse uma proteína cuja porção citoplasmática fosse inutilizada levava

à expressão do FT, mas a uma baixa taxa de VEGF. Se a cadeia de DNA inoculada, por outro lado, levasse somente à inativação da porção extracelular do FT, ou seja, a porção ligante do Fator VII ativado, os níveis de VEGF eram semelhantes àqueles vistos em tumores produtores de FT. Zhang e colaboradores (70) descreveram mais recentemente resultados semelhantes aos descritos anteriormente, só que utilizando linhagens celulares de tumores gástricos. Da mesma maneira, células inoculadas com mutações da porção extracelular da molécula de FT produziam altos níveis de VEGF. Se a mutação, entretanto, afetasse a região intracelular, mesmo que a expressão do FT estivesse plenamente demonstrada, a produção do VEGF ficava significativamente comprometida.

Se, por um lado, a porção citoplasmática do fator tecidual foi associada à produção do VEGF em linhagens tumorais, a porção ligante extracelular teve sua participação associada à disseminação de tumores malignos. Mueller e Ruf (79) desenvolveram um modelo experimental de metástases hematogênicas dependentes de FT que demonstrou a importância do complexo FT/FVIIa na evolução de lesões neoplásicas. Ao que parece, existe a necessidade da ação proteolítica deste complexo para o favorecimento da disseminação das células tumorais através da corrente sangüínea.

Amirkhosravi e colaboradores (72) avaliaram a importância da hipóxia, um achado freqüente em neoplasias malignas, no aumento da expressão do FT em tecidos tumorais. Ao cultivarem células de vários tipos de neoplasias em meios com baixa tensão de oxigênio, relataram um aumento da atividade pró-coagulante bem como da expressão do FT. Ao injetarem estas culturas em cobaias, notaram que aquelas expostas à baixa tensão de oxigênio (O₂) produziram mais trombocitopenia e metástases pulmonares do que células cultivadas com níveis normais de O₂. Em conclusão, os autores relataram 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 mais associado à atividade coagulante do FT, portanto de sua porção relacionada ao fator VII ativado, do que a sua porção intra-citoplasmática.

Em conjunto com estes achados, diversos estudos foram desenvolvidos para avaliar a frequência da expressão do FT e correlacioná-la com fatores prognósticos classicamente reconhecidos nos mais variados tipos de neoplasias malignas.

Seto e colaboradores (80) 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 colaboradores (81) avaliaram a expressão de FT em 100 tumores malignos colo-retais. O fator tecidual estava presente em 57% da amostra e a intensidade de sua expressão se correlacionou com a classificação de Dukes destes tumores. Além disto, observou-se uma relação significativa entre a expressão do FT e a do VEGF. Tais dados sugerem 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.

Contrino e colaboradores (82) avaliaram a expressão do FT em carcinomas de mama e encontraram também uma relação prognóstica. Ao analisarem a atividade do FT na superfície vascular endotelial de pacientes portadores de neoplasias malignas, relataram que em sete casos havia atividade desta proteína a nível do endotélio assim como em células tumorais. Em comparação, em dez casos de doença fibrocística, nenhum apresentou análise imuno-histoquímica positiva para o FT. Os autores concluíram que células tumorais

podem ativar células endoteliais adjacentes à lesão e estimular a proliferação de vasos sanguíneos justa-tumorais através de um importante estímulo angiogênico mediado pelo fator tecidual.

Vrana e colaboradores (83) 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. Células positivas para o FT eram particularmente abundantes nas proximidades de lesões infiltrativas, 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.

Mais recentemente, Kato e colaboradores (84) observaram um efeito sinérgico entre a progesterona e a expressão do FT em um modelo experimental baseado em células de carcinoma mamário. A incubação de células da linhagem ZR 75 em meio rico em progesterona foi acompanhada de um aumento da atividade do RNAm e da expressão do próprio FT. Tal efeito foi acompanhado de um incremento da atividade pró-coagulante desta linhagem celular, bem como do seu potencial invasor. Para os autores, o efeito da progesterona estimulando a expressão do FT representa uma vantagem em termos de viabilidade das células tumorais e um risco nos casos de reposição hormonal em pacientes portadoras de câncer de mama.

Hamada e colaboradores (85) avaliaram a expressão do FT em 44 espécimes cirúrgicos de gliomas. Seus dados concluíram que o nível de expressão se relacionava grau histológico de malignidade, uma vez que 10% dos gliomas definidos como de baixo grau apresentavam positividade para o FT, enquanto que 86% dos astrocitomas anaplásicos e 95% dos glioblastomas expressavam de forma moderada ou intensa esta mesma proteína.

Kakkar e colaboradores (86) avaliaram 55 casos de carcinomas ductais pancreáticos quanto à expressão do FT. Observaram que tumores pouco diferenciados apresentavam maior atividade do fator tecidual que inclusive não estava presente em tecidos pancreáticos não neoplásicos.

Nitori e colaboradores (87) avaliaram a frequência da expressão do fator tecidual, correlacionando-a a fatores prognósticos também em neoplasias ductais pancreáticas. A expressão aumentada, considerada no estudo 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. De fato, a expressão do FT se mostrou como uma variável prognóstica de valor independente para recorrência e óbito por este tipo de neoplasia. Os autores relataram ainda que a inativação do FT por bloqueio do RNAm reduziu o potencial invasor *in vitro* de células tumorais pancreáticas, o que o associa com a agressividade deste tipo de tumor.

Para Khorana e Fine (88), a expressão freqüente do FT pelas células malignas pancreáticas representa a principal razão para ocorrência de fenômenos típicos de coagulopatia, como tromboembolismo, 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.

Poon e colaboradores (89), 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 sangüíneos 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 colaboradores (90), da mesma forma, 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 nos pacientes com lesões negativas para atividade do FT, o que, nesta amostra, demonstrou que o mesmo é um fator prognóstico negativo independente.

Em casos de adenocarcinoma de próstata, Abdulkhadir (68) e Carvalhal (91) demonstraram que a atividade do fator tecidual na membrana celular teve associação direta com níveis mais elevados de PSA. Quando quantificada a densidade microvascular nestas lesões, os índices mais elevados foram observados nos casos positivos para FT, levando os autores a concluir que a sua expressão poderá servir como um marcador da agressividade dos tumores prostáticos, assim como um indicador de angiogênese aumentada. Akashi e colaboradores (92) 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.

Wang e colaboradores (93) descreveram a importância dos fatores relacionados à coagulação, dentre eles o FT, na progressão e evolução clínica das neoplasias ovarianas de origem epitelial. Análises de DNA demonstraram aumento da atividade de genes relacionados a proteínas de coagulação e à inflamação no peritônio pélvico e em regiões próximas a implantes. Tal expressão teve correlação com atividade proliferativa celular, potencial de invasão, angiogênese, produção de ascite e metástases.

Por fim, Koomagi e colaboradores (94) estudaram a expressão do fator tecidual em 191 neoplasias malignas pulmonares do tipo não pequenas células. Nestes casos, a atividade do FT se correlacionou com a intensidade da expressão do VEGF e com a densidade microvascular das lesões. A positividade das células tumorais para o FT foi também associada a um pior prognóstico, com redução significativa da sobrevida após o tratamento.

Frente a estes achados o estudo das interações entre o fator tecidual e o câncer, especialmente no que se refere ao seus mecanismos de ação, pode abrir um campo alternativo de tratamento das neoplasias malignas, envolvendo não só o controle da expressão de substâncias pró-angiogências, mas também dos sistemas regulatórios da coagulação sanguínea.

Objetivos

- Descrever a expressão do fator tecidual em adenocarcinomas colo-retais de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico no Serviço de Colo-Proctologia do Hospital São Lucas da PUCRS (HSL-PUCRS).
- Relacionar a intensidade da expressão do fator tecidual com a densidade microvascular dos tumores colo-retais.
- Relacionar a intensidade da expressão do fator tecidual com:
 - Idade e sexo dos indivíduos analisados.
 - Profundidade de penetração na parede intestinal pela neoplasia colo-retal.
 - Ocorrência de metástases linfáticas.
 - Localização das lesões no intestino.
 - Sobrevida dos pacientes tratados.
 - Sítios de recorrência metastática.
 - Diferenciação histológica das neoplasias.

Pacientes e métodos:**1) Seleção da amostra e material utilizado:**

Desenvolvemos um estudo no qual foram analisados dados anátomo-patológicos e de acompanhamento clínico de 43 pacientes atendidos no Serviço de Colo-proctologia do Hospital São Lucas da PUCRS no período de 1993 a 1998 com diagnóstico de adenocarcinoma do cólon e reto.

Foram incluídos no estudo aqueles indivíduos submetidos exclusivamente a ressecções intestinais com ou sem anastomose associada, seguindo padrões oncológicos terapêuticos e não paliativos. Os pacientes seguiram acompanhamento clínico, laboratorial e endoscópico no Serviço de Colo-proctologia do Hospital São Lucas da PUCRS, sendo os casos de recidivas tumorais documentados por exame físico, provas laboratoriais (provas de função hepática, marcadores tumorais ou testes específicos do órgão afetado), testes de imagem (ecografia, tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética) e seguimento clínico do desfecho final (óbito ou resolução). Foram incluídos todos os pacientes operados no período e que atenderam os pré-requisitos acima descritos.

Para análise das variáveis principais do estudo (expressão do fator tecidual e densidade microvascular) utilizaram-se espécimes dos tumores colo-retais armazenados no Laboratório de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS sob a forma de blocos de parafina. O material coletado foi avaliado pelo pesquisador e por um patologista do próprio laboratório quanto à representatividade da neoplasia através de corte e coloração com hematoxilina-eosina.

Os dados referentes aos achados anátomo-patológicos foram aqueles originalmente obtidos na análise dos espécimes ressecados e utilizados para a definição do estadiamento clínico-patológico realizado imediatamente após as intervenções cirúrgicas. Tais

informações encontravam-se armazenadas no próprio laboratório de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS, sendo complementados com informações clínicas contidas nos prontuários médicos guardados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística do HSL-PUCRS.

Foram coletados dados referentes a:

- Idade e sexo dos pacientes;
- Localização dos tumores no reto ou cólon;
- Grau de diferenciação histológica das neoplasias subdivididas em três categorias: adenocarcinomas bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados (95);
- Profundidade de penetração na parede intestinal, sendo os tumores agrupados em 4 categorias de acordo com o estadiamento anátomo-patológico das lesões colo-retais: carcinomas invasores de submucosa; da muscular própria do intestino; da serosa ou gordura peri-intestinal; e de estruturas adjacentes;
- Metástases para cadeias linfáticas regionais do intestino;
- Sobrevida após o tratamento do adenocarcinoma colo-retal quantificada em meses após a cirurgia.

2) Análise da expressão do fator tecidual:

Secções de tecido neoplásico foram preparadas através de método imunoistoquímico com anticorpos monoclonais anti-fator tecidual (*Mouse anti-human tissue factor, type 1 US Biological – type Mab, IgG1 clone 2K1*). A reatividade para o FT foi avaliada utilizando-se microscópio óptico Zeiss Axioskop 40 (*Oberkohen, Alemanha*) com magnificação de 100X

e classificada de acordo com o percentual de glândulas malignas positivas para o antígeno pesquisado. A expressão do FT foi subdividida em 4 grupos (78,91):

1. Zero a 25% das glândulas de carcinoma coradas;
2. Vinte e seis a 50% das glândulas de carcinoma coradas;
3. Cinquenta e um a 75% das glândulas de carcinoma coradas;
4. Setenta e seis a 100% das glândulas de carcinoma coradas.

Esta variável foi avaliada independentemente por dois 2 observadores treinados, não havendo discordância entre os dados computados para este quesito. As figuras 1 e 2 exemplificam a classificação acima proposta com lesões na categoria 1 e 4.

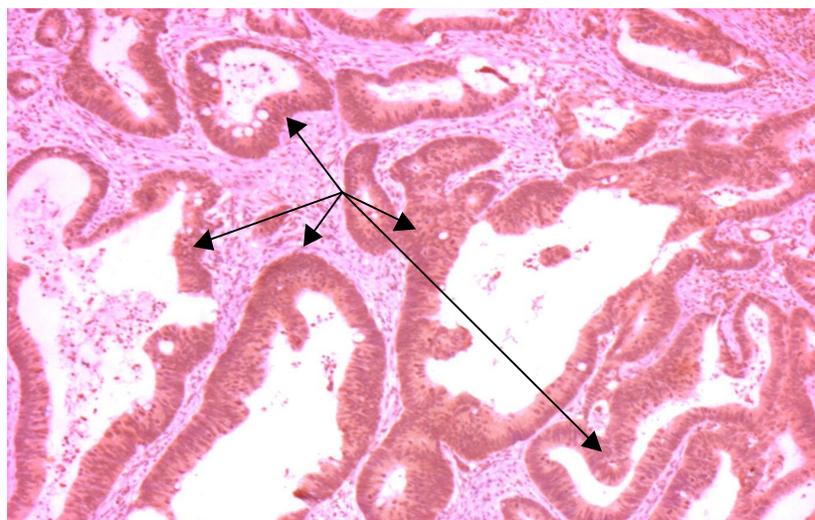


Figura 1: Exemplo da expressão do fator tecidual em 100% das glândulas de um adenocarcinoma colo-retal. As setas apontam glândulas neoplásicas expressando intensamente o fator tecidual.

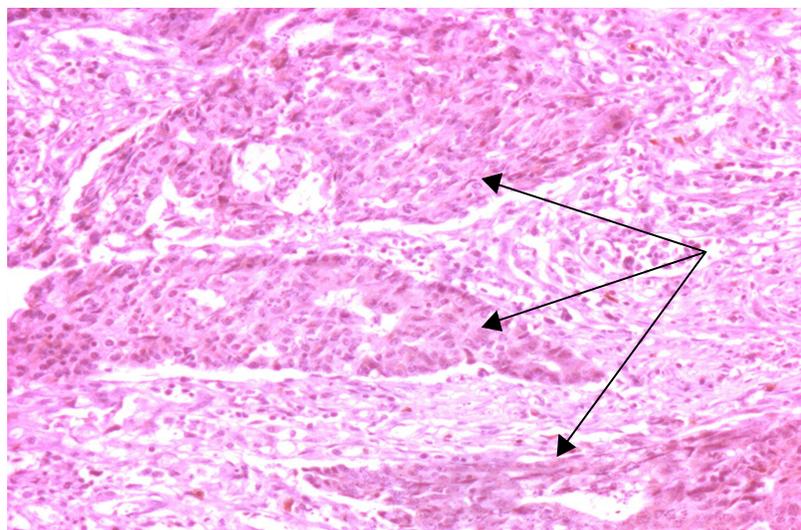


Figura 2: Exemplo de expressão ausente do fator tecidual em glândulas de adenocarcinoma (indicadas por setas) em um caso de nossa amostra.

3) Quantificação da densidade microvascular

A contagem de microvasos foi realizada utilizando-se marcação imunoistoquímica com anticorpo anti-CD34 endotelial (*CD34 classe II Clone QBEnd 10, Dakocytomation, EUA*) em secções de tecido neoplásico obtidas consecutivamente a partir dos mesmos blocos de parafina empregados para avaliação da expressão do fator tecidual. Para a realização da contagem do número de vasos sanguíneos por área de tumor utilizou-se método de captura digital de imagens das lesões analisadas. Foi utilizado o sistema de análise de imagens do Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS, composto por um microscópio ótico Zeiss Axioskop 40 (*Oberkohen, Alemanha*) com lentes plan-neofluares conectado através de uma videocâmera *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 de imagens foi utilizado o programa *Image Pro Plus* versão 4.5. Este programa permite a captura de uma imagem digital com a possibilidade da inserção de grade de correção, marcação e contagem das áreas de interesse. As imagens foram armazenadas no formato TIFF (*True Image Format File*) para análise posterior. Histologicamente, os microvasos foram identificados pela coloração acastanhada, em contraste com fundo de cor azul claro (hematoxilina). A identificação da microvascularização foi realizada através da seleção das áreas mais vascularizadas, preferencialmente na região periférica do tumor, examinadas com magnificação de 100X. Estas áreas hipervascularizadas, ou “*hot spots*”, são representativas dos locais de maior densidade microvascular. Após a sua identificação, foi realizada a captura da imagem em 20 campos diferentes para a contagem dos vasos com uma magnificação de 400X, com resolução de 1392X1040 pixels por 0,76mm². Qualquer célula endotelial separada de microvasos adjacentes foi contada como um microvaso. Não foi necessária a visualização da luz vascular ou a presença de hemácias, pois o diâmetro médio dos capilares é de 10 a 12 micrômetros, semelhante ao maior diâmetro de uma hemácia. Tanto células isoladas quanto vasos maiores, porém sem parede muscular ou adventícia foram incluídos na contagem. A inserção de uma grade de correção resultou em um campo com amplitude de 1312X960 pixels, correspondendo à área de 0,66 mm². Somente foram contados os vasos dentro da área da grade, ou que tocassem a linha de demarcação pontilhada. A contagem foi realizada numa escala ordinal e após foi realizada a média aritmética dos 20 campos selecionados em cada “*hot spot*” (96).

4) Técnica de imunohistoquímica:

A partir dos tecidos fixados e incluídos em parafina referentes aos tumores incluídos no estudo, cortes com espessura de 3 μm foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria por 30 minutos à 99°C utilizando tampão Tris/EDTA, pH 9 (20 mM Tris/0,65 mM EDTA). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito utilizando solução de peridrol 3% (H_2O_2 em álcool metílico) por 30 minutos. Os cortes foram imersos em soro fisiológico normal a 5% com tampão PBS (*Phosphate binding saline*) por 30 minutos para diminuir o background. As secções foram incubadas com anticorpo monoclonal de rato anti-Fator Tecidual tipo 1 (*Mouse anti-human tissue factor, type 1 US Biological – type Mab, IgG1 clone 2K1*) com diluição de 1:30 e anticorpo anti-humano monoclonal de rato para CD34 (*CD34 classe II Clone QBEnd 10 Dakocytomation*) com diluição de 1:400. O sistema de detecção utilizado foi com o Kit Dako LSAB + peroxidase (Streptoavidina). Os cortes foram revelados usando o cromógeno 3,3'-diaminoazobenzidina em solução tampão PBS e 0,002% de peróxido de hidrogênio e contra-corados com hematoxilina. Os cortes em lâminas foram então desidratados, clarificados e finalmente montados com bálsamo e lamínula.

5) Análise estatística:

Os dados categóricos foram descritos por frequência e percentual e os quantitativos por média e desvio padrão. A comparação da idade e da densidade vascular por campo no “hotspot” foi realizada entre os grupos de alta e baixa expressão do fator tecidual pelo teste t de Student. As demais variáveis foram comparadas entre esses mesmos grupos com o teste de qui-quadrado. As análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS

versão 12.0, sendo a figura 4 elaborado pelo programa SigmaPLot versão 8.0. Para a comparação da sobrevida nos dois grupos, foram elaboradas curvas do tipo Kaplan-Meier.

6) Aspectos bioéticos da pesquisa:

O presente estudo foi apresentado aos Comitês de Ética e de Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS previamente ao início da coleta dos dados, tendo obtido autorização de ambos para sua realização (Ofícios 174/04-PG e 606/04-CEP).

Resultados

1) Características da amostra estudada:

Foram analisados os dados clínicos e anátomo-patológicas dos 43 pacientes incluídos no estudo. Nesta população, a média de idade foi de $58,1 \pm 12,64$ anos, sendo 16 (37,2%) indivíduos do sexo feminino e 27 (62,8%) do sexo masculino. Os tumores se localizavam mais frequentemente no reto (60,4%), sendo que a maioria já apresentava extensão até a serosa ou ao tecido gorduroso peri-intestinal (72,1%). A cadeia linfática regional apresentava comprometimento por adenocarcinoma em 20 pacientes analisados (46,5%).

Na classificação quanto ao grau de diferenciação histológica das neoplasias, os adenocarcinomas moderadamente diferenciados foram aqueles mais frequentemente observados, representando 72,1% da amostra.

Durante o acompanhamento, 22 pacientes (51,1%) apresentaram recidiva da doença, sendo o óbito constatado, em média, com $27,6 \pm 12,84$ meses de pós-operatório. O sítio mais frequentemente observado como primeiro local de recidiva neoplásica foi o fígado, com 50% dos casos de nossa amostra. Nos indivíduos sem evidências de recidiva tumoral, o tempo médio de acompanhamento foi de $103,8 \pm 34,53$ meses.

Os dados detalhados referentes aos pacientes e suas lesões podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Características clínicas e anátomo-patológicas da amostra.

<i>Variáveis</i>	<i>Subclassificação</i>	<i>Total</i>
1) Média de idade		58,1 ±12,64 anos
2) Localização	Reto	26 (60,4%)
	Sigmóide	5 (11,6%)
	Descendente	4 (9,3%)
	Transverso	1 (2,3%)
	Ascendente	7 (16,4%)
3) Linfáticos	Com metástases	20 (46,5%)
	Sem metástases	23 (53,5%)
4) Profundidade da lesão no intestino	Submucosa	2 (4,6%)
	Muscular própria	7 (16,4%)
	Serosa	31 (72,1%)
	Estruturas vizinhas	3 (6,9%)
5) Evolução	Sem recorrência	21 (48,9%)
	Com recorrência	22 (51,1%)
	Total	11 (50%)
	Fígado	2 (9,2%)
	Carcinomatose	1 (4,5%)
	Pulmão	1 (4,5%)
	Cérebro	1 (4,5%)
	Pâncreas	1 (4,5%)
	Pelve	6 (27,3)
6) Diferenciação histológica	Bem	2 (4,6%)
	Moderadamente	31 (72,1%)
	Pouco	10 (23,3%)

2) Expressão do fator tecidual:

A intensidade da expressão do fator tecidual em tumores de nossa amostra foi significativa. Trinta e oito pacientes (88,4%) apresentavam lesões que expressavam intensamente o fator tecidual (76-100% das células tumorais positivas para FT, grupo 4). Em três tumores (7%), a atividade do FT foi quantificada em 0 a 25% das glândulas, o que corresponde ao grupo 1, e dois casos (4,6%) foram incluídos no grupo 2 (26-50% das glândulas positivas para FT). Não foram identificados pacientes no grupo 3 (51-75% das células coradas para FT).

Em função do pequeno número de pacientes alocados nos demais grupos e da polarização observada na intensidade da expressão do FT, para melhor análise estatística, os casos incluídos nos grupos 1 e 2 foram estudados em conjunto, formando um novo grupo (0-50% das glândulas positivas para FT). As figura 3 ilustra um caso com elevada expressão do fator tecidual tanto no citoplasma quanto na membrana celular encontrado em nossa amostra.

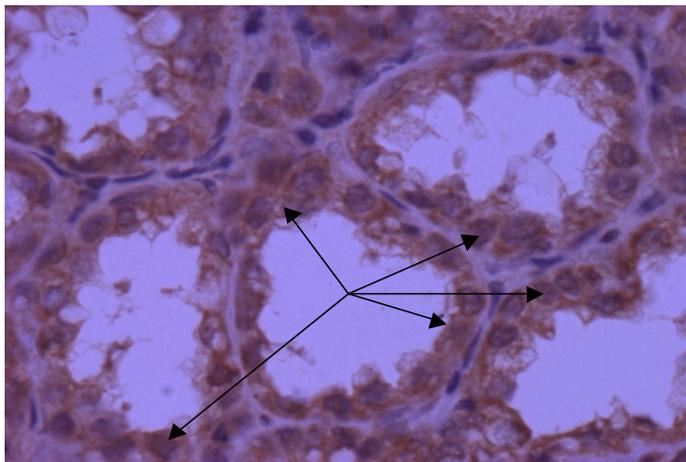


Figura 3: Fotomicrografia de grande aumento demonstrando a expressão do fator tecidual em glândulas neoplásicas de adenocarcinoma colo-retal.

3) Relação entre a expressão do fator tecidual e a densidade microvascular:

Observamos que, entre as lesões que apresentavam alta expressão do fator tecidual (grupo 4), a média da contagem de microvasos por campo de grande aumento foi de $28,4 \pm 10,1$. Já naqueles casos com expressão de ausente à moderada (grupos 1 e 2) e que foram reunidos em um novo grupo de expressão fraca do fator tecidual, a média da contagem foi de $17,1 \pm 7,9$ vasos por campo. A análise comparativa entre a média destes dois grupos se mostrou estatisticamente significativa, com valor $p=0,022$, como vemos na figura 4.

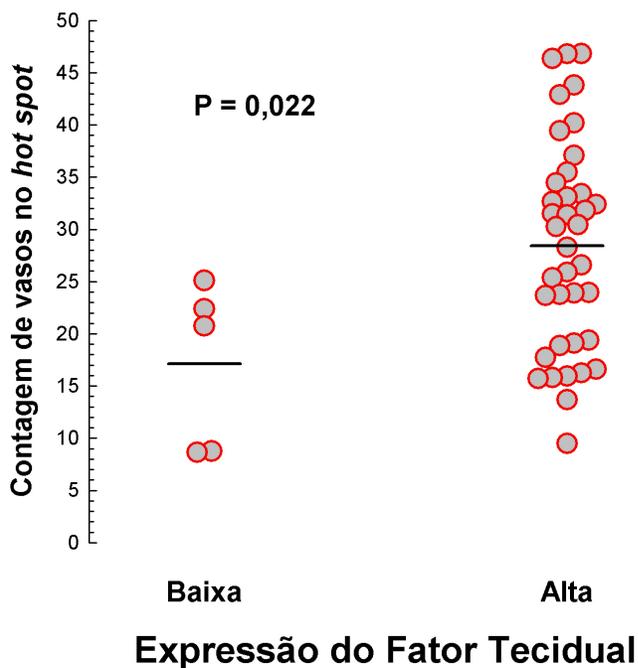


Figura 4 – Gráfico de *dotplot* representando a densidade vascular, expressa pela contagem de vasos por campo no *hotspot*, em relação à intensidade de marcação imunohistoquímica para o fator tecidual

4) **Relação entre a intensidade da expressão do fator tecidual e fatores clínicos e anátomo-patológicos na amostra:**

Na análise final dos dados referentes à população estudada observamos os resultados que seguem:

- A média de idade dos indivíduos no grupo com alta expressão do fator tecidual foi de $60,2 \pm 11,5$ anos, em comparação com uma média de $42,6 \pm 10,2$ anos observada nos casos de expressão mais reduzida, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).
- Quanto à distribuição por sexo, não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição de mulheres e homens entre os grupos de expressão alta ou reduzida do fator tecidual.
- Quanto à classificação dos tumores pelo grau de diferenciação histológica, no grupo de expressão elevada do fator tecidual observamos duas lesões bem diferenciadas (5,3%), 28 carcinomas moderadamente diferenciados (73,7%) e oito pouco diferenciados (21%). Nos tumores com baixa expressão do FT não observamos lesões bem diferenciadas, sendo três casos classificados como moderadamente diferenciados (60%) e dois tumores considerados como pouco diferenciados (40%). Não foi observada diferença estatisticamente significativa na comparação entre os dois grupos ($p = 0,67$).
- Na análise comparativa entre os dois grupos de expressão do fator tecidual em relação à profundidade de penetração na parede intestinal, entre os casos com expressão reduzida foram encontrados quatro lesões invasoras da serosa ou gordura peri-intestinal (80% das lesões no grupo) e uma lesão restrita a muscular própria do intestino (20%). No grupo com elevada expressão do FT, duas lesões eram limitadas à submucosa (5,2%),

seis atingiam a muscular própria do intestino (15,8%), 27 progrediam até a serosa ou gordura peri-intestinal (71,1%) e três comprometiam estruturas adjacentes (7,9%). A distribuição pouco pareada comprometeu a análise estatística. Optou-se então por agrupar as lesões em uma nova subdivisão: tumores de invasão limitada à parede, com extensão submucosa ou até a muscular própria do intestino; e lesões francamente invasoras, comprometendo a serosa ou gordura peri-intestinal, ou mesmo invadindo estruturas adjacentes. Novamente, a diferença observada se mostrou sem diferença estatística significativa. Na tabela 2, no item penetração, observa-se a frequência das lesões francamente invasoras estratificadas pela expressão do fator tecidual.

- Com relação à invasão da cadeia linfática regional do intestino, três pacientes no grupo com expressão reduzida do fator tecidual apresentavam metástases linfonodais (60% dos casos no grupo) em comparação com 17 (44,7%) no grupo de expressão elevada. A diferença não foi considerada estatisticamente significativa.
- Quanto à evolução clínica dos pacientes tratados e acompanhados, observou-se que, dos 22 indivíduos que apresentaram recaída da doença, três (60% dos pacientes no grupo) encontravam-se entre os casos de expressão baixa do fator tecidual e 19 (50% do grupo) entre os de alta expressão. Na amostra estudada, todas as recidivas dos tumores coloreticais evoluíram para óbito em função da doença. No grupo de baixa expressão do FT, o tempo médio de sobrevida foi de 77 meses (IC: 24 – 130 meses). No grupo com expressão elevada, a média da sobrevida foi de 89 meses (IC: 69-109 meses). A diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,69$). O gráfico 5 apresenta a curva de sobrevida observada entre os casos de alta e baixa expressão do FT. Em ambos os grupos, o fígado foi o sítio mais frequente de metástases, sendo impossível uma análise

comparativa detalhada do padrão de recorrência em função da distribuição variável na frequência do local da recidiva neoplásica.

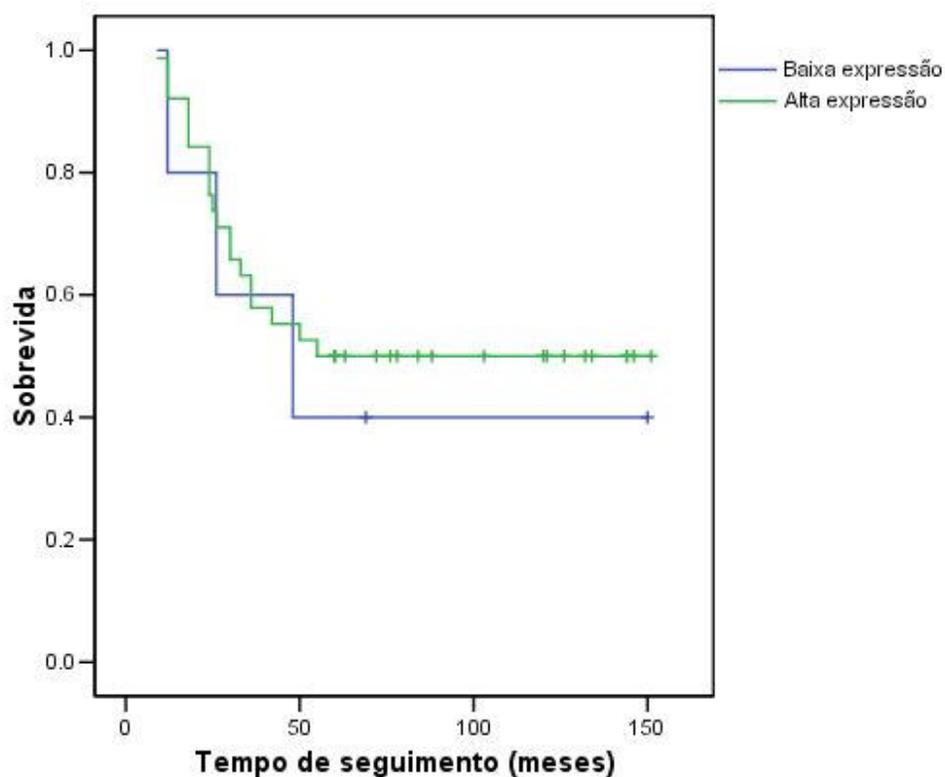


Figura 5: Curva comparativa da sobrevivência dos pacientes tratados em relação à intensidade da expressão do fator tecidual.

- Na distribuição dos casos com alta ou baixa expressão do fator tecidual em relação à localização do tumor primário, o reto foi o local mais prevalente em ambas as situações,

com 60% dos casos nos dois grupos. Novamente, a ampla variação da localização dos tumores combinado com o pequeno número de indivíduos no grupo com baixa expressão impediu uma análise estatística detalhada.

A tabela 2 apresenta um resumo dos achados clínicos e anátomo-patológicos em um quadro comparativo quanto à expressão do fator tecidual.

Tabela 2 – Características dos pacientes com tumor colo-retal segundo os níveis de expressão do fator tecidual

Característica	Expressão do fator tecidual		P
	Baixa n = 5	Alta N = 38	
Sexo masculino, n° (%)	3 (60,0)	24 (63,2)	1,00
Idade, anos	42,6±10,2	60,2±11,5	<0,01
Tipo histológico, n° (%)			0,67
Bem diferenciado	0 (0,0)	2 (5,3)	
Moderadamente diferenciado	3 (60,0)	28 (73,7)	
Pouco diferenciado	2 (40,0)	8 (21,0)	
Penetração extensa na parede, n° (%)*	4 (80,0)	30 (78,9)	1,00
Metástases em linfonodos, n° (%)	3 (60,0)	17 (44,7)	0,65
Metástase sistêmica, n° (%)	3 (60,0)	19 (50,0)	1,00
Densidade microvascular, vasos/campo	17,1±7,9	28,4±10,1	0,02

Os dados são apresentados como n° (percentual) ou média±desvio padrão.

Discussão

A relevância da frequência da expressão do fator tecidual em tumores malignos no ser humano foi demonstrada diversas vezes na literatura internacional (80,81,82,83,85,87,89,91,94). Como apresentado, a relação entre elementos ligados ao mecanismo de coagulação já havia sido observada e descrita no final do século 19 (59). Neste mesmo período foi também descrita a presença freqüente de coágulos sangüíneos e depósito de material semelhante à fibrina em neoplasias malignas, aumentando o interesse no estudo da interação entre a progressão do câncer e a cascata da coagulação (97). Mais recentemente, o aperfeiçoamento do método científico possibilitou a identificação de elementos da coagulação relacionados ao câncer, contribuindo para ampliar a compreensão sobre a história natural deste grupo de doenças. Os possíveis mecanismos desta interação envolvem (97): ativação direta da cascata da coagulação por células neoplásicas circulantes na corrente sangüínea, fato relacionado aos estados de hipercoagulabilidade observados em pacientes com câncer; ativação de fatores de coagulação em sítios extravasculares nos tumores malignos; indução da produção de fatores relacionados à coagulação sangüínea por células inflamatórias recrutadas pelo hospedeiro para a resposta imunológica ao tumor.

O fator tecidual produzido pelas neoplasias malignas parece participar da progressão do câncer por mecanismos não só relacionados à cascata da coagulação, mas também através de um sistema de sinalização intracelular não dependente diretamente de elementos da coagulação sangüínea (59,70,74,75,97). Um dos principais pontos envolvidos no estudo do papel desempenhado pelo fator tecidual no desenvolvimento do câncer é sua habilidade de estimular a produção de vasos sangüíneos, fenômeno este já várias vezes relacionado a um pior prognóstico oncológico em diversos tipos de lesões malignas (25,26,31).

Os nossos achados quanto à frequência da expressão do fator tecidual no câncer colo-retal sugerem a importância do mesmo no estudo destes tumores. Em nossa amostra, 88,3% dos casos analisados apresentavam níveis consideráveis de fator tecidual na estrutura das glândulas neoplásicas. Tais números são indicativos de que o fator tecidual está presente e, como vimos, interage com outros elementos significativos para a progressão do câncer colo-retal em uma parcela expressiva dos indivíduos portadores da doença. Tal representatividade tem amplo respaldo na literatura internacional.

Gordon e Mielicki (98), em sua revisão sobre anormalidades hemostáticas relacionadas ao câncer, descreveram o fator tecidual como uma das substâncias mais relevantes na avaliação da atividade pró-coagulante de células isoladas de tumores malignos humanos. De fato, Callander e colaboradores (99) descreveram que pelo menos 60% dos tumores de origem epitelial produzem fator tecidual, o qual podia ser detectado por método imunistoquímico. Mais significativo ainda para o objetivo do presente estudo foi o fato de que, nas amostras estudadas por estes autores, as lesões do trato gastrointestinal apresentaram altos índices de positividade para o FT, sendo a análise imunistoquímica positiva em 100% das lesões de estômago e pâncreas. Carvalhal (91), em sua série de adenocarcinomas de próstata observou expressão elevada do FT em 73% dos casos analisados, correlacionando este índice a fatores prognósticos significativos para este tipo de tumor. Em outros estudos, neoplasias de diversas linhagens também demonstraram altas taxas de positividade para o FT. Hamada e colaboradores (85) demonstraram que 86% dos astrocitomas anaplásicos de sua amostra eram moderada ou altamente positivos para a expressão do FT, sendo que, entre os glioblastomas, tal índice atingia 95%.

No caso específico do adenocarcinoma colo-retal os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados em outros estudos desse mesmo tipo de neoplasia. Callander e

colaboradores (99) descreveram que 75% das lesões colo-retais avaliadas para expressão do FT eram positivas à análise imunoistoquímica. Seto e colaboradores (80), em 67 casos de tumores de cólon e reto, observaram expressão do FT em 31 lesões (46%). Este número é significativamente menor do que o encontrado em nossa amostra. Devemos observar que Seto descreveu uma relação estatisticamente significativa entre a expressão do fator tecidual e o estágio clínico visto pela classificação TNM, com tumores mais avançados apresentando uma proporção maior de atividade do FT. Analisando detidamente o tamanho de sua amostra, vemos que os tumores avaliados tinham uma distribuição de acordo com o TNM bastante uniforme, com 14 casos (21%) no estágio I, em comparação com 2 indivíduos (4,6%) neste mesmo estágio em nossa casuística. Nakasaki e colaboradores (81) chegaram à conclusão semelhante, relacionando a expressão do fator tecidual com o estágio clínico da doença, sendo que 84,6% das lesões no estágio III apresentavam significativa atividade do FT em comparação com 41,2% no estágio I. Uma vez que 83,7% da amostra aqui estudada era composta de lesões localmente avançadas, o índice de expressão do fator tecidual encontrado acompanha o que é observado na literatura, não sendo possível demonstrar, como Seto e Nakasaki fizeram, uma relação estatisticamente significativa entre a atividade do FT e o estágio TNM, por provável limitação do número de pacientes em estágios mais precoces da doença.

De importância significativa há também a identificação de um dos prováveis mecanismos da interação entre a atividade do fator tecidual e o comportamento de neoplasias malignas. No nosso estudo, a expressão do FT foi associada a angiogênese tumoral, efeito este demonstrado através de uma densidade microvascular maior em lesões com alta atividade do FT em comparação com aqueles tumores com baixa expressão desta proteína. Este dado também apresenta amplo respaldo na literatura.

Carvalho (91) observou contagens microvasculares significativamente maiores em lesões definidas como de elevada positividade para o fator tecidual. Para o autor, a relação entre a expressão do fator tecidual e a angiogênese tumoral ficou particularmente fortalecida através da contagem de microvasos nas proximidades das regiões onde a atividade do FT era especialmente pronunciada. Com base nisso, fica caracterizada a hipótese de uma relação causal entre a presença do FT nas células tumorais e o resultante incremento na produção de vasos sanguíneos pelas lesões.

Outros autores observaram relação semelhante entre a presença do fator tecidual e a contagem de vasos sanguíneos. Poon e colaboradores (89) descreveram contagens microvasculares elevadas em carcinomas hepatocelulares que apresentavam atividade do FT, fato este acompanhado de um pior prognóstico oncológico. Koomagi e colaboradores (94) chegaram a esta mesma conclusão estudando neoplasias pulmonares do tipo não pequenas células. De comum entre estes dois estudos, devemos observar que ambos realizaram concomitantemente pesquisa para presença de VEGF nas lesões, concluindo que o incremento na produção de vasos sanguíneos nos tumores foi resultado da ação desta proteína, sendo provável que sua produção foi estimulada pela presença do fator tecidual.

Em adenocarcinomas colo-retais, Seto e colaboradores (80) reconheceram a importância prognóstica da expressão aumentada do FT, mas não encontraram uma relação estatisticamente significativa entre sua atividade e a presença de VEGF. Os autores reconhecem a possibilidade de que outros agentes relacionados à presença do fator tecidual podem ser os responsáveis pela disseminação metastática dos carcinomas de cólon e reto, mecanismos estes eventualmente ainda associados a um incremento na produção de vasos sanguíneos tumorais.

Estes dados são importantes na análise do presente estudo. Observou-se aqui uma relação estatisticamente significativa entre a intensidade da expressão do fator tecidual e a densidade microvascular. Tal relação aponta para um mecanismo de estímulo angiogênico associado à presença do fator tecidual em neoplasias colo-retais. Estudos prévios haviam indicado a existência de um mecanismo de sinalização intracelular mediado pelo complexo FT/FVIIa que determinaria um aumento na produção de VEGF pelas células tumorais (59,70,74,77). Seto e colaboradores (80), ao não demonstrarem uma relação entre a expressão do fator tecidual e a presença aumentada de VEGF, levantaram a possibilidade de que outros mecanismos estejam presentes, tanto para incrementar a progressão dos tumores quanto para estimular a produção de vasos sanguíneos. Estes mesmos autores colocaram como um limitador dos resultados apresentados pelo seu estudo o fato de não terem pesquisado a densidade microvascular. Ao demonstrar que a atividade aumentada do FT esta associada a uma maior produção de vasos sanguíneos, nosso estudo sugere a expansão do leque de possibilidades de pesquisa no sentido de identificar outros possíveis mecanismos angiogênicos ligados à expressão do FT e à cascata da coagulação.

Apesar de termos encontrado uma relação entre angiogênese e a presença do fator tecidual, não observamos um impacto significativo no prognóstico dos casos estudados frente à expressão desta proteína. Nossa revisão bibliográfica mostrou resultados muitas vezes conflitantes em relação à importância prognóstica da contagem de microvasos (44,45,46,47,48,49,50,51,52). A angiogênese tumoral e a resultante disseminação metastática, entretanto, são eventos multifatoriais dependentes de um balanço estrito entre agentes pró e anti-angiogênicos (24). 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.

Por fim, entre as diversas variáveis clínicas e anátomo-patológicas comparadas com a expressão do fator tecidual, além da densidade microvascular, a única que demonstrou resultados estatisticamente significativos foi a média de idade dos indivíduos estudados. O grupo com expressão reduzida do fator tecidual era significativamente mais jovem do que o grupo com alta expressão. Seto e colaboradores (80) também observaram, na sua série, que pacientes com lesões com baixa expressão do FT tinham uma média de idade menor do que os que expressavam intensamente a proteína, não sendo a diferença, entretanto, estatisticamente significativa. Não encontramos na literatura evidências semelhantes às que observamos em nossa série. Estes dados, entretanto, merecem referência para observação futura em comparação com outros estudos.

Perspectivas de novos estudos envolvendo o fator tecidual e o câncer colo-retal:

Frente a frequência e a intensidade da expressão do FT no adenocarcinoma colo-retal, abrem-se inúmeras perspectivas de estudo tanto na avaliação da fisiopatologia da progressão dos tumores em combinação com a cascata da coagulação, como na possibilidade de novas abordagens terapêuticas.

Seto (80) sugeriu a possibilidade de que outros mecanismos moleculares além do VEGF estejam associados a um estímulo angiogênico incrementado pelo fator tecidual. O mesmo autor observou um pior prognóstico nas lesões com alta expressão desta proteína. Como o VEGF parece ter sua produção estimulada pela atividade da porção intracitoplasmática do FT, resta avaliar o significado que a porção extracelular ligante ao Fator VII tem sobre a progressão da doença. Siegbahn (100) sugeriu que a ativação de elementos da cascata da coagulação mediada pelo complexo FT/FVIIa conduziria ao encapsulamento de células neoplásicas por fibrina e plaquetas o que poderia estar relacionado a disseminação sistêmica e formação de metástases. A identificação da produção aumentada ou do consumo exagerado de elementos da coagulação sanguínea poderiam contribuir para a elucidação da participação deste mecanismo na evolução do câncer colo-retal.

O estudo da relação entre a cascata da coagulação e progressão do câncer pode ter também aplicações terapêuticas. Ao serem identificadas lesões com maior atividade do FT, medidas mais enérgicas na prevenção de fenômenos tromboembólicos podem reduzir a mortalidade dos pacientes tratados (67). No caso do câncer colo-retal, tal medida pode ser ainda mais importante. Lwaleed e colaboradores (101) observaram, em modelos experimentais, que eventos de natureza infecciosa no pós-operatório podem resultar em aumento da produção de FT o que poderia levar a um maior risco de trombose e embolia.

Uma vez que o elemento central do tratamento do câncer de cólon e reto é a cirurgia e frente ao fato de que as ressecções do intestino grosso e reto resultam em um potencial infeccioso considerável, a presença aumentada do FT nos tumores pode resultar em um risco elevado de complicações tromboembólicas no período peri-operatório. Resta também averiguar se tal reação apresenta efeito prognóstico a médio ou longo prazo no controle da neoplasia.

Um outro campo de aplicação do conhecimento da participação do fator tecidual na progressão dos tumores é o do diagnóstico e acompanhamento de indivíduos portadores de neoplasias malignas. Lwalled e colaboradores (102) realizaram dosagens urinárias de FT em pacientes portadores de doenças inflamatórias e de neoplasias benignas e malignas de mama e de cólon. 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, sendo que 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 serve como um parâmetro prognóstico e é útil no acompanhamento para detecção de recorrências metacrônicas de tumores colo-retais submetidos a tratamento.

Por fim, surgem também opções terapêuticas através do bloqueio da cascata da coagulação com resultante efeito antiangiogênico. Mousa e colaboradores (103), através de estudos “*in vitro*” e em cobaias, demonstraram a ação antiangiogênica da tinzaparina, um derivado de baixo peso molecular da heparina. O mecanismo de ação parece envolver a ativação intracelular do chamado inibidor da rota do fator tecidual (“*tissue factor pathway inhibitor*”, TFPI). Os autores demonstraram um bloqueio angiogênico com o uso da tinzaparina em células de adenocarcinoma de cólon implantadas na membrana

corioalantóide de embriões de galinha, mecanismo este que pode ter aplicação clínica em humanos.

Conclusões

A análise dos dados coletados em nosso estudo nos permitiu chegar às seguintes conclusões:

- O FT apresenta expressão freqüente e intensa na membrana celular e no citoplasma de células de adenocarcinoma do cólon e reto.
- Existe uma relação positiva entre o grau da expressão do fator tecidual e a angiogênese tumoral, com densidade microvascular significativamente mais alta em lesões nas quais a atividade do FT é elevada.
- Indivíduos portadores de tumores colo-retais com alta expressão do FT são, em média, mais idosos do que aqueles com pouca ou nenhuma atividade desta proteína.
- Não foi observada relação entre a intensidade da expressão do FT e:
 - a profundidade de penetração na parede intestinal pela neoplasia;
 - a ocorrência de metástases linfáticas regionais;
 - a sobrevida dos pacientes;
 - o grau de diferenciação histológica dos tumores;
 - os sítios de recorrência da doença;
 - o sexo dos pacientes tratados;
 - a localização das lesões no intestino.

Lista de abreviaturas

INCA: Instituto Nacional do Câncer.

AJCC: American Joint Committee on Cancer.

TNM: “tumor, node, metastases”; Tumor, nódulos linfáticos e metástases.

VEGF: vascular endothelial growth factor; fator de crescimento do endotélio vascular.

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

TGFs: “transforming growth factors”; fatores de crescimento transformadores.

DMV: densidade microvascular

FT: fator tecidual

FT/FVIIa: complexo FT/Fator VII ativado.

FXa: Fator 10 ativado.

DNA: Ácido desóxi-ribonucleico.

HSL-PUCRS: Hospital São Lucas da PUCRS.

TIFF: True Image Format File.

PBS: Phosphate binding saline.

Bibliografia

- 1) Habr-Gama A. Câncer colorretal- A importância de sua prevenção. Arq Gastroenterol 2005;42(1):2-3.
- 2) Neves FJ, Mattos IE, Koifman RJ. Mortalidade por câncer de cólon e reto nas capitais brasileiras no período 1980-1997. Arq Gastroenterol 2005;42(1): 63-70.
- 3) Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LAG, Schrag D, Jamison PM, Jemal A, Wu XC, Friedman C, Harlan L, Warren J, Anderson RN, Pickle LW. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. J Natl Cancer Inst 2005;97:1407-27.
- 4) Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde do Brasil. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2006. [http:// www.inca.org.br](http://www.inca.org.br), março de 2006.
- 5) Philips R, Hittinger R, Blesovsky L. Large bowel cancer: surgical pathology and its relationship to survival. Br J Surg 1984;71:604-17.
- 6) Green FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller DG, Morrow M. AJCC cancer staging manual. Springer, New York, 6th edition 2002
- 7) Nelson R, Abcarian H. Pattern of disease, staging and therapeutic implications. In: Wanebo HJ. Colorectal cancer. St Louis: Mosby-year book, 1993. P 130-146.
- 8) Lindmark G, Gerdin B, Pahlman L, Bergström R, Glimelius B. Prognostic predictors in colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1994;37:1219-1227.
- 9) Wiggers T, Arends J, Schutte B, Volovics L, Bosmann F. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. Cancer 1988;61:386-395.

- 10) Jessup J. Clinical prognostic factors in resectable cooonic and rectal cancers. In: Cohen A, Winaver S. Cancer of the colon, rectum and anus. New York: Mcgraw-Hill Inc., 1995. P 217-224.
- 11) Steinberg S, Barwick K, Stablein D. Importance of tumor pathology and morphology in patients with surgically resected colon cancer. *Cancer* 1986;58:1340-5.
- 12) Arbmán G, Nilsson E, Störger-Fordell V, Sjö Dahl R. Outcome of surgery for colorectal cancer in a defined population in Sweden from 1984 to 1986. *Dis Colon Rectum* 1995;38:645-50.
- 13) Violi V, Pietra N, Grattarola M, Sarli L, Choua O, Roncoroni L, et al. Curative surgery for colorectal cancer: long-term results and life expectancy in the elderly. *Dis Colon Rectum* 1998;41:291-8.
- 14) Whittle J, Steiberg E, Anderson G, Herbert R. Results of colectomy in elderly patients with colon cancer, based on medicare claims data. *Am J Surg* 1992;163:572-6.
- 15) Eisenberg B, Decosse J, Harford F. Carcinoma of the colon and rectum: the natural history reviewed in 1704 patients. *Cancer* 1982;49:1131-4.
- 16) Philips R, Hittinger R, Blesovsky L. Local recurrence following curative surgery for large bowel cancer. *Br J Surg* 1984;71:12.
- 17) Steinberg S, Barkin J, Kaplan R, Stablein D. Prognostic indicators of colon tumors: the gastrointestinal tumor study group experience. *Cancer* 1986;57:1866-70.
- 18) Cohen A, Wood W, Gunderson L, Shinnar M. Pathological studies in rectal cancer. *Cancer* 1980;45:2965-8.
- 19) Saclarides T, Bhattacharyya A, Britton-Kuzel C, Szeluga D, Economou S. Predicting lymph node metastases in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1994;37:52-7.

- 20) Wolmark N, Cruz I, Redmond C, Fisher B, Fisher E. Tumor size and regional lymph node metastasis in colorectal cancer. *Cancer* 1983;51:1315-22.
- 21) Talbot I, Ritchie S, Leighton M. The clinical significance of invasion of veins by rectal cancer. *Br J Surg* 1980;67:439-42.
- 22) Minsky B, Mies C, Retch A. Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum: II. The influence of blood vessel invasion. *Cancer* 1988;61:1417-24.
- 23) Shirouzu K, Isomoto H, Morimatsu M. A prospective clinicopathologic study of venous invasion in colorectal cancer. *Am J Surg* 1991;162:216-20.
- 24) Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastrointestinal tumors. *Eur J Can* 1996;32(14):1501-5.
- 25) Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* 2002; 6(16):15-18.
- 26) Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and near future. *Carcinogenesis* 2000; 21(3):505-15.
- 27) 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; 223:1296-99.
- 28) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-1039.
- 29) Saclarides TJ. Angiogenesis in colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 1997;77(1): 253-60.
- 30) Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996;32A(14):2451-60.

- 31) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.
- 32) Cantu De Leon D, Lopez-Graniel C, Frias Mendivil M, Chanona Vilchis G, Gomez C, De La Garza Salazar J. Significance of microvascular density (MVD) in cervical cancer recurrence. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13(6):856-62.
- 33) Garcia de la Torre N, Buley I, Wass JA, Jackson DG, Turner HE. Angiogenesis and lymphangiogenesis in parathyroid proliferative lesions. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2890-6.
- 34) 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.
- 35) Nayha V, Viitanen T, Stenback 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.
- 36) Sonmezer M, Gungor M, Ensari A, Ortac 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.
- 37) 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.
- 38) 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.

- 39) Ichinoe M, Mikami T, Shiraishi H, Okayasu I. High microvascular density is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expression in penetrating growth-type early gastric carcinomas. *Histopathology* 2004;45(6):612-8.
- 40) Tsujitani S, Saito H, Maeta Y, Yamaguchi K, Tatebe S, Kondo A, Kaibara N. 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.
- 41) 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.
- 42) Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, Wu W, Qiu LW, Meng XY. 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.
- 43) Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E. Tumor angiogenesis and rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1994;37:921-6.
- 44) Frank R, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node negative colon cancer. *Ann Surg* 1995;222:695-9.
- 45) Tanigawa N, Amaya H, Matsunura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, Muraoka R. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1997;57:1043-6.

- 46) Kaio E, Tanaka S, Kitadai Y, Sumii M, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K. Clinical significance of angiogenic factor expression at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma. *Oncology* 2003;64(1):61-73.
- 47) Tarta C. Análise digital de imagem e estereologia da angiogênese em adenomas e no carcinoma colorretal invasivo de submucosa (tese). Porto Alegre: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.
- 48) Banner BF, Whitehouse R, Backer SP, Swanson RS. Tumor angiogenesis in stage 2 colorectal carcinoma: association with survival. *Am J Clin Pathol* 1998;109:733-7.
- 49) Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C. Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996;14:461-6.
- 50) Cianchi F, Palomba A, Messerini L, Boddi V, Asirelli G, Perigli G, Bechi P, Taddei A, Pucciani F, Cortesini C. Tumor angiogenesis in lymph node negative rectal cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis. *Ann Surg Oncol* 2002; 9(1):20-6.
- 51) Abdalla SA , Behzad F , Bsharah S , Kumar S , Amini SK , O'Dwyer ST , Haboubi NY Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours. *Oncol Rep* 1999;6(4):839-42.
- 52) 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.
- 53) Carmeliet P, Collen D. Molecules in focus: tissue factor. *Int J Biochem & Cell Biol* 1998;30:661-7.
- 54) Banner DW. The factor VIIa/ Tissue factor complex. *Thromb Haemost* 1999;78:512-5.

- 55) Higashi S, Iwanaga S. Molecular interaction between factor VII and tissue factor. *Int J Hematol* 1998;67:229-41.
- 56) Toshi V, Gallo R, Fallon JT, Gertz SD, Fenandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95:594-9.
- 57) Jang Y, Guzman M, Lincoff M, Gotssauner-Wolf M, Forudi F, Hart CE, Courtman DW, Ezban M, Ellis SG, Topol EJ. Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation* 1995;92:3041-50.
- 58) Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Van Vlaenderen P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Müller M, Risau W, Edgington T, Collen D. *Nature* 1996;383:73-5.
- 59) Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin and cancer. *Chest* 2003;124:58S-68S.
- 60) Rickles FR, Levine MN. Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol* 2001; 106:6-12.
- 61) Prandoni P, Lensing AW, Buller HR. Deep vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med* 1992;327:1128-33.
- 62) Goad KE, Gralnick HR. Coagulation disorders in cancer. *Hematology/oncology Clinics of North America* 1996;10(2):457-62.
- 63) Sawada M, Myiake S, Ohdama S, Matsubara O, Masuda S, Yakumaru K, Yoshizawa Y. Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. *Br J Cancer* 1999;79:472-7

- 64) Guan M, Jin J, Su B. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clin Biochem* 2002;35:321-5.
- 65) Ueno T, Toi M, Koike M. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer* 2000;83:164-70.
- 66) Ueda C, Hiroata Y, Kihara Y. Pancreatic cancer complicated by disseminated intravascular coagulation associated with production of tissue factor. *J Gastroenterol* 2001;36: 848-50.
- 67) Lykke J, Nielsen HJ. The role of tissue factor in colorectal cancer. *EJSO* 2003;29: 417-22.
- 68) Abdulkadir AS, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol* 2000;31(4):443-7.
- 69) Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nature Med* 1996;2:167-8.
- 70) 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.
- 71) Mousa S. Tissue factor/VIIa in thrombosis and cancer. In: *Anticoagulants, antiplatelets and thrombolytics*. Humana Press, New Jersey, 2004.
- 72) Amirkhosravi A, Meyer T, Warnes G, Amaya M, Malik Z, Biggerstaff JP, Siddiqui FA, Sherman P, Francis JL. Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost* 1998;80:598-602.

- 73) Olivier V, Chabbat J, Herbert JM. 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;20:1374-81.
- 74) Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* 2004;30(1):31-44.
- 75) Yu JL, May L, Klement P, Weitz JI, Rak J. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb Hemost* 2004;30(1):21-30.
- 76) Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A, Vlasuk JP, Rote WE, Green SJ, Pribluda VS. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Research* 2003;63:2997-3000.
- 77) 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.
- 78) Abe K, Shoji M, Chen J, Bierhaus A, Danave I, Micko C, Casper K, Dillehay D, Nawroth PP, Rickles F. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8363-8.
- 79) Mueller BM, Ruf W. Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest* 1998;101(7):1372-8.
- 80) Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A, Ishigami S, Arii S, Imamura M. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma. *Cancer* 2000;88:295-301.

- 81) Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, Nakamura S, Shiku H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002;69(4):247-54.
- 82) 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. *Nature Med* 1996;2:209-15.
- 83) 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;56:5063-70.
- 84) Kato S, Pinto M, Carvajal A, Espinoza N, Monso C, Sadarangani A, Villalon M, Brosens JJ, White JO, Richer JK, Horwitz KB, Owen GI. Progesterone increases tissue factor gene expression, procoagulant activity, and invasion in the breast cancer cell line ZR-75-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Feb;90(2):1181-8.
- 85) Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer* 1996;77:1877-83.
- 86) 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;28:1-6.
- 87) Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, Kosuge T, Kanai Y, Kitajima M, Hirohashi S. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2531-9.

- 88) Khorana AA, Fine RL. Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol* 2004;5(11):655-63.
- 89) 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.
- 90) Kaido T, Oe H, Yoshikawa A, Mori A, Arii S, Imamura M. Tissue factor is a useful prognostic factor of recurrence in hepatocellular carcinoma in 5-year survivors. *Hepatology* 2005;52(65):1383-7.
- 91) Carvalhal GF. Análise imuno-histoquímica da expressão do fator tecidual no câncer de próstata de humanos: correlação com angiogênese e aspectos clínico-patológicos (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2001.
- 92) 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.
- 93) Wang X, Wang E, Kavanagh JJ, Freedman RS. Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. *J Transl Med* 2005; 21:3-25.
- 94) Koomagi, 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;79:19-22.
- 95) Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds). World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the digestive system. IARC Press: Lyon 2000.
- 96) Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A. Some new, simple and efficient

stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96(5):379-94.

- 97) Shoji M, Hancock WW, Abe K, Micko C, Casper KA, Baine RM, Wilcox JN, Danave I, Dillehay DL, Matthews E, Contrino J, Morrissey JH, Gordon S, Edginton TS, Kudryk B, Kreutzer DL, Rickles FR. Activation of coagulation and angiogenesis in cancer. Immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. *Am J Pathol* 1998;152 (2):399-411.
- 98) Gordon SG, Mielicki WP. Cancer procoagulant: a factor X activator, tumor marker and growth factor from malignant tissue. *Blood Coag Fibrinol* 1997;8:73-88.
- 99) Callander NS, Varki N, Rao VM. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer* 1992;70:1194-1201.
- 100) Siegbahn A. Cellular consequences upon factor VIIa binding to tissue factor. *Haemostasis* 2000; 30(Suppl. 2):41-7.
- 101) Lwaleed BA, Bass PS, Cooper AJ. The biology and tumor-related properties of monocyte tissue factor. *J Pathol* 2001;193(1):3-12.
- 102) Lwaleed BA, Chisholm M, Francis JL. Urinary tissue factor levels in patients with breast and colorectal cancer. *J Pathol* 1999;187(3):291-4.
- 103) Mousa SA, Mohamed S. Anti-angiogenic mechanisms and efficacy of the low molecular weight heparin, tinzaparin: anti-cancer efficacy. *Oncol Rep* 2004;12(4): 683-8.
- 104) Meert AP, Paesmans M, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Verdebout JM, Lafitte JJ, Mascaux C, Sculier JP. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2002;87(7):694-701.

- 105) Barbera-Guillem E , Nyhus JK , Wolford CC , Friece CR , Sampsel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res* 2002;62(23):7042-9.
- 106) Reinmuth N , Liu W , Fan F , Jung YD , Ahmad SA , Stoeltzing O , Bucana CD , Radinsky R , Ellis LM. Blockade of insulin-like growth factor I receptor function inhibits growth and angiogenesis of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3259-69.
- 107) Faviana P , Boldrini L , Spisni R , Berti P , Galleri D , Biondi R, Camacci T , Materazzi G , Pingitore R , Miccoli P , Fontanini G. Neoangiogenesis in colon cancer: correlation between vascular density, vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 protein expression. *Oncol Rep* 2002;9(3):617-20.
- 108) Ahmad SA , Liu W , Jung YD , Fan F , Reinmuth N , Bucana CD , Ellis LM. Differential expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in colon carcinoma. A possible mechanism for the initiation of angiogenesis. *Cancer* 2001;92(5):1138-43.
- 109) de Fraipont F , Nicholson AC , Feige JJ , Van Meir EG. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med* 2001;7(9):401-7.
- 110) Ahmad SA , Liu W , Jung YD , Fan F , Wilson M , Reinmuth N , Shaheen RM , Bucana CD , Ellis LM. The effects of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res* 2001;61(4):1255-9.
- 111) Lee JC , Chow NH , Wang ST , Huang SM. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in colorectal cancer patients. *Eur J Cancer* 2000;36(6):748-53.

- 112) Zanetta L , Marcus SG , Vasile J , Dobryansky M , Cohen H , Eng K, Shamamian P , Mignatti P. Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2000;85(2):281-8.
- 113) Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003;9(6):653-60.
- 114) Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;16(5):10931-4.
- 115) Carmeliet P, Rakesh KJ. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-57.
- 116) Browder T, Folkman J, Pirie-Sheperd. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* 2000;275(3):1521-4.
- 117) Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW, Flick MJ, Holmbäck K, Danton MJS, Colbert MC, Witte DP, Fujikawa K, Davie EW, Degen JL. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6258-63.
- 118) Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber BL, Mackman N, Rak JW. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005;105(4):1734-1741.
- 119) Versteeg HH. Tissue factor and tumor cells:as bad as it gets? *Blood* 2005; 105(4):1374.
- 120) Zhang Y, Deng Y, Luther M, Ziegler R, Waldherr R, Stern DM, Nawroth PP. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumors in mice. *J Clin Invest* 1994;94:1320-27.

- 121) 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 1995;92:8205-9.
- 122) Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. Blood 1996;88(5):1583-7.
- 123) Rosen ED, Chan JC, Idusogie E, Clotman F, Vlasuk G, Luther T, Jalbert LR, Albrecht S, Zhong L, Lissens A, Schoonjans L, Moons L, Collen D, Castellino FJ, Carmeliet P. Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. Nature 1997;390:290-3.
- 124) Gando S, Kameue T, Nanzaki S, Hayakawa T, Nakanishi Y. Participation of tissue factor and thrombin in posttraumatic systemic inflammatory syndrome. Crit Care Med 1997;25(11):1820-6.
- 125) Ardissino DA, Merlini PA, Ariëns R, Coppola R, Bramucci E, Mannucci PM. Tissue factor antigen and activity in human coronary atherosclerotic plaques. Lancet 1997; 349:769-71.
- 126) Kataoka H, Uchino H, Sasada Y, Hatakeyama K, Nabeshima K, Sumiyoshi A, Kono M. Analysis of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor expression in human colorectal carcinoma cell lines and metastatic sublines to the liver. Int J Cancer 1997; 72:878-84.
- 127) Lindahl AK. Tissue factor pathway inhibitor: from unknown coagulation inhibitor to major antithrombotic principle. Cardiovasc Res 1997;33:286-91.
- 128) Bajaj MS, Bajaj SP. Tissue factor pathway inhibitor: potential therapeutic applications. Thromb Haemost 1997;78(1):471-7.

- 129) Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *Thromb Haemost* 1997;78(1):747-54.
- 130) Sandset PM, Bendz B. Tissue factor pathway inhibitor: clinical deficiency states. *Thromb Haemost* 1997;78(1):467-70.
- 131) Taubman MB, Fallon JT, Schechter AD, Peter Giesen, Mendlowitz M, Fyfe BS, Marmur JD, Nemerson Y. Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1997;78(1):200-4.
- 132) Banner DW. The factor VIIa/tissue factor complex. *Thromb Haemost* 1997;78(1):512-5.
- 133) Costantini V, De Monte P, Cazzato AO, Stabile AM, Devegilia R, Frezzato E, Paolucci MC. Systemic thrombin generation in cancer patients is correlated with extrinsic pathway activation. *Blood Coag Fibrinol* 1998;9:79-84.
- 134) Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, Jesty J. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998;75:780-6.
- 135) Higashi S, Iwanaga S. Molecular interaction between factor VII and tissue factor. *Int J Hematol* 1998;67:229-41.
- 136) Shigemori C, Wada H, Matsumoto K, Shiku H, Nakamura S, Suzuki H. Tissue factor expression and metastatic potential of colorectal cancer. *Thromb Haemost* 1998;80(6):894-8.
- 137) Lykke J, Nielsen HJ. Haemostatic alterations in colorectal cancer: perspectives for future treatment. *J Surg Oncol* 2004;88(4):269-75.

- 138) Carty N, Taylor I, Roath OS, el-Baruni K, Francis JL. Urinary tissue factor activity in colorectal disease. *Br J Surg.* 1990;77(10):1091-4.
- 139) Francis JL. Haemostasis and cancer. *Med Lab Sci.* 1989;46(4):331-46.
- 140) Yu JL, May L, Klement P, Weitz JI, Rak J. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb Hemost* 2004;30(1):21-30.
- 141) Shpitz B, Gochberg S, Neufeld D, Grankin M, Buklan G, Klein E, Bernheim J. Angiogenic switch in earliest stages of human colonic tumorigenesis. *Anticancer Res* 2003 ;23(6D):5153-7.
- 142) Vermeulen PB, Gasparinib G, Foxc SB, Colpaerta C, Marsond LP, Gione M, Beliënf JAM, de Waalg RMW, Van Marcka E, Magnanib E, Weidnerh N, Harris AL, Dirixj LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer* 2002;38(12):1564-1579.