

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA- PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA EM CLÍNICA CIRÚRGICA

Carla Costa Moreira

**EXPRESSÃO DO FATOR TECIDUAL (FT) NO TUMOR DE
WILMS POR REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE EM
TEMPO REAL (RT-PCR).**

Porto Alegre
2011

Carla Costa Moreira

EXPRESSÃO DO FATOR TECIDUAL (FT) NO TUMOR DE WILMS POR REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR).

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof.Dr.Vinicius Duval da Silva
Coorientador: Prof.Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior

Porto Alegre
2011

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

C838e Moreira, Carla Costa.

Expressão do fator tecidual (FT) no tumor de Wilms por reação da cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) / Carla Costa Moreira. Porto Alegre: PUCRS, 2011.

98 f.: graf.; il.; tab. Inclui artigo de periódico submetido à publicação.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva.

Co-orientador: Prof. Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior.

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. TUMOR DE WILMS/genética. 2. TROMBOPLASTINA. 3. EXPRESSÃO GÊNICA. 4. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. 5. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Silva, Vinicius Duval da. II. Batista Júnior, Eraldo Luiz. III. Título.

CDD 616.99461

Bibliotecária Responsável:
Sabrina Caimi Silva da Costa
CRB 10/1606

Dedico à minha amada filha Clara
Iluminas minha vida

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof.Dr. Vinicius Duval da Silva, minha gratidão pela confiança, gentileza, incentivo e paciência, auxiliando-me incondicionalmente nesta pesquisa.

Ao meu coorientador Prof.Dr.Eraldo Luiz Batista Júnior, um exemplo de profissionalismo, caráter, incentivo à pesquisa e excelência acadêmica. Por todos os ensinamentos que contribuíram e contribuem em minha formação profissional.

Ao prodigioso Tiago Giuliani pelo carinho, empenho e disposição em todos os momentos em que busquei sua ajuda. Muito obrigada pelos valiosos ensinamentos.

À minha adorável amiga Ana Carolina Uchoa, companheira fundamental em todos os momentos de minha vida

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Ministério da Educação, pela oportunidade de crescimento profissional, através dos cursos de Mestrado e Doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, por ter me proporcionado a realização do doutorado e o privilégio de ter participado de um curso de qualidade e excelente formação.

Ao meu amado Eraldo Júnior. Você não apenas impulsiona meus sonhos e realizações, mas é a concretização de sonhos não antes sonhados.

À minha amada mãe, Maria Aparecida, ao meu inesquecível pai, Armando (*in memoriam*) irmãos, Andréa, Armando e Sabrina Regina, que sempre incentivaram e apoiaram meus sonhos.

À minha sobrinha e afilhada Luiza Fernanda, a mais doce das crianças, desculpe-me as ausências, mas um dia também te ajudarei com seus sonhos. E, ao meu sobrinho que ainda está para chegar, mas já o amamos.

A toda minha amada família, tios, primos, cunhados e, em especial, minha maravilhosa avó Doralice por todo carinho e incentivo.

Aos meus adoráveis sogros, Alba e Eraldo Batista. Obrigada por toda carinhosa atenção e apoio.

À Prof.Dra.Elinês Oliva Maciel que gentilmente nos cedeu todo material necessário para pesquisa e por todo apoio dado ao trabalho.

Ao médico patologista Aluísio Maciel pelo auxílio na leitura das lâminas histopatológicas.

Aos professores do doutorado pelo conhecimento transmitido e incentivo.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação em Medicina, em especial ao Ernesto, por todo organizadíssimo trabalho e carinhosa atenção nos dada.

A todos os funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital São Lucas da PUCRS pela atenção e apoio oferecidos.

À minha querida colega e amiga Norlai Azevedo, companheira e incentivadora de todos os momentos desse percurso do doutorado.

Aos meus formidáveis amigos Antônio, Patrícia e Janaína Nunez, obrigada por toda carinhosa atenção.

Às minhas amigas e companheiras na vida Ana Aline, Patrícia Paiva, Claudinha Albuquerque (*in memoriam*), Letícia Post, Mara Diógenes, Geilma Vieira, Raquel Pessoa, Lúcia Sperb, Lisandra Pinheiro, Fernanda Zanon e Paula Brinckmann que sempre me ajudam a superar os momentos difíceis e que, assim como eu, acreditam que a distância não separa amizades especiais.

Às crianças e seus pais que participaram indiretamente desta pesquisa, que a ciência possa um dia oferecer a liberdade para crescerem felizes, com prazer e sem sentirem a dor e o sofrimento tão cedo.

A todos aqueles que direta, ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*Não é a intensidade dos sentimentos elevados que faz os
homens superiores, mas a sua duração*
Nietzsche

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo demonstrar a expressão diferencial do fator tecidual (FT) em tumor de Wilms (TW), através de um estudo do tipo transversal. O TW é a neoplasia renal maligna mais comum na infância. Os estudos sobre angiogênese em neoplasias malignas pediátricas apresentam possíveis vias de terapias antiangiogênicas, com menor agressividade e melhor especificidade tumoral. E, entre os fatores angiogênicos possíveis, foi estudo o Fator Tecidual (FT), proteína transmembrana com sua principal função no processo de hemostasia, mas que demonstra ter importante papel nos processos patológicos de tumorigênese, angiogênese e microambiente tumoral favorável à disseminação neoplásica. Sua expressão vem sendo associada às metástases e piora no prognóstico. Contudo, só a partir da pesquisa de Maciel et al (1) que a associação do FT com TW foi observada, onde se encontrou, utilizando imunistoquímica, a correlação positiva entre a expressão do FT, recidiva tumoral e óbito. Então, a partir desses dados iniciais, a presente pesquisa analisou uma amostra com 27 espécimes fixadas em parafina de TW e 26 controles (área sem TW), para demonstrar a expressão diferencial do FT em TW, através da técnica de quantificação de ácidos nucleicos (RNAm) por Reação Cadeia de DNA Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), avaliar a expressão do FT em diferentes componentes tumorais, com a densidade microvascular (DMV) do TW e a ocorrência de metástases. Foi observado aumento da expressão diferencial do FT no TW, sua maior variação do FT foi encontrada nos componentes blastematoso e epitelial, enquanto no componente estromal apresentou variação mínima em relação ao tecido não tumoral, em lesões metastáticas o FT se mostrou significativamente mais elevado, sugerindo um papel importante para essa proteína no processo de disseminação dessas células malignas, o aumento da DMV apresentou associação positiva com a expressão do FT. Os resultados apresentados corroboram os achados de Maciel et al (1) de forma mais concisa e quantitativa, enfatizando a importância do FT na biologia do TW.

Palavras-chave: Tumor de Wilms, Fator tecidual, angiogênese, tumorigênese, expressão gênica.

ABSTRACT

The Wilms Tumors (WT) is the most frequent renal tumors of children, and although curable, fatal outcomes may occur. A number a genetic alterations have been suggested as associated factors but still, the exact pathogenesis of WT remains to be fully characterized. Tissue factor (TF) is a glycoprotein which happens to be a key receptor for factor VII/VIIa and is the primary initiator of blood coagulation. Also important, TF has been associated with processes that lead to angiogenesis. It is widely expressed among cells and tissues and recent evidences pointed out an important role for TF in cancer progression and metastasis. Recent evidences suggested that TF may have a role in WT since its immunodetection was associated with poor prognosis. In the present investigation the differential expression of TF was assessed in WT using real-time PCR of RNA retrieved from paraffin sections using microdissection. Different histological components of WT - (blastema, epithelial and stromal) were analysed and the results revealed that TF in blastema and epithelial components was upregulated (14.38 and 16.02-fold respectively, $P < 0.001$). Stroma and control non neoplastic tissues expressed similar levels of expression ($P > 0.05$). TF expression in metastatic lesions from WT was also significantly upregulated compared to non metastatic lesions. Microvessel density was positively correlated with TF expression ($r = 0.721$). As described for other tumors, TF seems to play a role in malignancy or WT. Further investigations are warranted to better understand the pathways by which TF exerts its effects on tumor progression. Noteworthy, pharmacological strategies that aim at controlling angiogenesis through regulation of TF may be very promising.

Key words: Tissue Factor, nephroblastoma, gene expression, Metastasis, microvessel density

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1.** ORGANOGRAMA UTILIZADO PELO SIOP-9. 32
- FIGURA 2.** ESQUEMA DA CASCATA DA COAGULAÇÃO, PROPOSTO NA DÉCADA DE 1960, COM A DIVISÃO DO SISTEMA DE COAGULAÇÃO EM DUAS VIAS. CAPM: CININOGENÍO DE ALTO PESO MOLECULAR; PK: PRÉ-CALICREÍNA. (128). 46
- FIGURA 3 -** MODELO ATUAL DA CASCATA DA COAGULAÇÃO BASEADO EM SUPERFÍCIES CELULARES *IN VIVO* ADAPTADO DE HOFFMAN (2003): (A) FASES DE INICIAÇÃO, (B) AMPLIFICAÇÃO E (C) PROPAGAÇÃO (133). 48
- FIGURA 4.** SUMÁRIOS DOS PROCEDIMENTOS EMPREGADOS NA ETAPA DE PRÉ-AMPLIFICAÇÃO DA AMOSTRAS E QUANTIFICAÇÃO FINAL. 68
- FIGURA 5.** HISTOGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO DO FT EM AMOSTRAS TUMORAIS E CONTROLE. OBSERVA-SE QUE A FASE DE AMPLIFICAÇÃO LINEAR SE INICIA EM CICLAGENS MAIS BAIXAS EM TUMORES, ATESTANDO O MAIOR NÚMERO DE MOLÉCULAS DE FT NESSAS AMOSTRAS. 74
- FIGURA 6.** DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POR COMPONENTE RELATIVO A EXPRESSÃO DO FT. 75
- FIGURA 7.** COMPARAÇÕES DAS MÉDIAS DE EXPRESSÃO DO FT POR COMPONENTE. COMPONENTES BLASTEMATOSOS E EPITELIAIS APRESENTARAM EXPRESSÃO MAIS ELEVADA DO FT ($P < 0.001$) COMPARATIVAMENTE A COMPONENTES ESTROMAIS E CONTROLE NÃO TUMORAIS. 76
- FIGURA 8.** EXPRESSÃO DO FT EM AMOSTRAS OBTIDAS DE TW METASTÁTICOS (+) E NÃO METASTÁTICOS (-). MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DE LESÕES METASTÁTICAS (N=12) E NÃO METASTÁTICAS (N=13). A EXPRESSÃO DO FT FOI MAIS ELEVADA EM TUMORES METASTÁTICOS ($P < 0.05$) 77
- FIGURA 9.** GRÁFICO DE REGRESSÃO DEMONSTRANDO A CORRELAÇÃO ENTRE A DMV E A EXPRESSÃO DO FT. A ASSOCIAÇÃO SE APRESENTOU POSITIVA ($P < 0.05$). 78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. SOBREVIDA DO TUMOR DE WILMS DO SIOP-9.	28
TABELA 2. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORS RENAI SIOP-9	31
TABELA 3. ESTADIAMENTO DO TUMOR DE WILMS.	33
TABELA 3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ANÁTOMO-PATOLÓGICA DA AMOSTRA (N-27)	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA -Ácido desoxirribonucléico complementar (*Complementary DNA*)
 CD34- *Cluster of Differentiation 34*
 COG- Grupo de Oncologia Pediátrica
 CP-BMF - Centro de pesquisas em biologia molecular e funcional
 CSCs- Células Troncos Tumorais (*Cancer stem cells*)
 DO- Densidade ótica
 DMV- Densidade microvascular
 DNA- Ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic acid*)
 DNase- Enzima de oxiribonuclease
 dNTPs- Desoxinucleotídeo trifosfato (*Deoxyribonucleotide*)
 EDTA- *Ethylene Diamine Triacetic Acid*
 EGF- Fator de crescimento epidérmico (*Epidermal growth factor*)
 EGFR- Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal growth factor receptor*)
 EtBr- Brometo de etídio (*Ethidium bromide*)
 FAMED- Faculdade de Medicina
 FGF2- Fator 2 de crescimento dos fibroblastos (*Basic fibroblast growth factor*)
 FVIIa- Fator sétimo ativado
 FXa- Fator X ativado
 GAPDH- Gliceraldeído fosfato desidrogenase humana (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)
 GCBTTW-Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento de Tumor de Wilms
 GB- *Gicabyte*
 HD- Histologia favorável
 HF- Histologia desfavorável
 H₂O- Água
 H₂O-MQ – Água bidestilada (MiliQ)
 IFN- Interferon
 IGF – 1- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*Insulin-like growth factor 1*)
 K-ras- *Rat sarcoma viral oncogene homolog*
 KSR1- Quinase supressora de Ras (*Kinase suppressor of Ras*)
 HSL-PUCRS- Hospital São Lucas da PUCRS
 H-ras- GTPase HRas, *transforming protein p21*
 MAPK – Proteína quinase ativadora de mitose (*Mitogen-activated protein kinases*)
 MEC- Matriz extracelular
 MPs- Micropartículas solúveis
 MgCl₂- Cloreto de Magnésio
 N-myc- Oncogene, derivado de neuroblastoma aviário (*V-myc myelocytomatosis viral related oncogene*)
 NWTS- *National Wilms Tumor Study*
 fatores de transcrição (EGR-1, NFκB, AP1 e NFAT)
 PAR1- Receptor ativado por protease 1 (*Protease-activated receptor-1*)
 PAR2- Receptor ativado por protease 2 (*Protease-activated receptor-2*)

PARs- Receptores da ativação da protease (Protease-activated receptor)
PBS- *Phosphate binding saline*
PF4- Fator plaquetário 4 (*Platelet factor 4*)
PKC- Proteína quinase C (*Protein kinase C*)
PTEN- Gene supressor de tumor (*Phosphatase and tensin homolog*)
PUCRS- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
p53- Proteína citoplasmática 53 (*tumor protein 53*)
p53- Gene supressor tumoral p53
RNA- Ácido Ribonucléico (*Ribonucleic acid*)
RNAm- Ácido ribonucléico mensageiro
RNI- Resto nefrogênico intralobular
RNP- Resto nefrogênico perilobular
RT/PCR- Reação de Cadeia de Polimerase em Tempo Real (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)
siRNA- *Short interfering RNA ou Silencing RNA*
SPSS- *Statistical Package for the Social Sciences*
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor- α*)
TW- Tumor de Wilms
TECNOPUC- Centro de Tecnologia da PUCRS
TF- Fator Tecidual (*Tissue Factor*)
TIFF- *True Image Format File*
TGFS- Fator de transformação do crescimento beta (*Transforming growth factor beta*)
Tris-EDTA- *Trisaminomethane-Ethylenediaminetetraacetic Acid*
SIOP- Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (*Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique*)
TBE- Tris, ácido bórico e EDTA
TFPI- Fator tecidual (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*)
TICs- Células Inciadoras Tumerais (*Tumour Initiating Cells*)
UK- Reino Unido (*United Kingdom*)
USA- Estados Unidos da América (United States of America)
VEGF- Fator de crescimento do endotélio vascular (*Vascular endothelial growth factor*)
WT1- Proteína do Tumor de Wilms -1 (*Wilms tumor protein-1*)
WT1- Gene supressor do tumor de Wilms (*Wilms' tumor suppressor gene*)

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa- kiloDalton

%- Porcentagem

g-Grama

U-Unidade universal

μ l- Microlitro

U/ μ l- Unidade por microlitro

$^{\circ}$ C- Grau(s) centígrado(s)

mM-Milimolar

ml-Mililitro

ng-Nanograma

nm- Nanômetro

min- Minuto

mm²- Milímetro quadrado

$\Delta\Delta$ Ct- Algoritmo de expressão relativa (delta-delta-Ct)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	TUMOR DE WILMS	21
2.1.1	Etiologia	22
2.1.2	Epidemiologia	25
2.1.3	Aspectos histopatológicos do Tumor de Wilms	29
2.1.4	Classificação	30
2.1.5	Estadiamento	32
2.2	FATORES PROGNÓSTICOS ONCOLÓGICOS	33
2.3	ANGIOGÊNESE TUMORAL: FISIOPATOLOGIA E IMPORTÂNCIA CLÍNICO-PATOLÓGICA	37
2.4	FATOR TECIDUAL: FUNÇÕES FISIOLÓGICAS E IMPORTÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE NEOPLASIAS MALIGNAS	45
3	OBJETIVOS	62
3.1	GERAL	62
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
4	METODOLOGIA	63
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	63
4.2	LOCAL DO ESTUDO	63

	18
4.3 SUJEITOS DE PESQUISA E MÉTODOS	63
4.3.1 Seleção da amostra e material utilizado	63
4.3.2 Aspectos bioéticos da pesquisa	64
4.3.3 Critérios de inclusão	64
4.3.4 Critérios de exclusão	65
4.4 QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE MICROVASCULAR	65
4.5 TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL	66
4.5.1 Microdissecções e extração do RNA total	66
4.5.2 Transcrição Reversa e pré-amplificação do cDNA	68
4.5.3 PCR quantitativo baseado em fluorescência	69
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
6 RESULTADOS	72
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	72
6.2 EXPRESSÃO DO FT EM TUMOR DE WILMS	73
6.3 EVENTOS METASTÁTICOS E EXPRESSÃO DO FT	76
6.4 DENSIDADE MICROVASCULAR (DMV) E EXPRESSÃO DO FT	77
7 DISCUSSÃO	79
8 CONCLUSÃO	84
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO A	97
ANEXO B	98

1 INTRODUÇÃO

O Tumor de Wilms (TW), ou Nefroblastoma, é uma neoplasia que se desenvolve em tecidos remanescentes dos rins imaturos (2). É a neoplasia renal maligna mais comum em crianças. Representa cerca de 8% dos tumores sólidos na infância, ocupando o quinto lugar em frequência. Nessa faixa etária, está atrás de tumores do Sistema Nervoso Central, Linfoma, Neuroblastoma e Sarcoma de tecidos moles (8). O TW afeta 1 em cada 10.000 crianças nascidas vivas (3-6), com igual frequência entre os sexos e com maior incidência entre 1 e 5 anos de idade, mais precisamente no terceiro ano de vida. Apesar da sua rara ocorrência no período neonatal, mais de 75% das crianças afetadas tem menos de quatro anos de idade, e pelo menos 90% tem menos de sete anos ao diagnóstico (3, 5-7).

O TW se apresenta como importante fator associado às vias de tumorigênese. Há indícios de que seus mecanismos de patogênese se distinguem pelas características da idade no diagnóstico, peso elevado ao nascimento, síndromes associadas ou não ao supercrescimento, histologia, presença de restos nefrogênicos perilobulares (RNP) e/ou intralobulares (RNI), mutações nas expressões dos genes *IGF2*, *WT1* e *WT2* e malformações genito urinárias (8). O TW ou nefroblastoma é o tumor renal embrionário sólido mais comum na infância, sendo 10% dos casos associados a síndromes dismórficas como: WAGR (TW, aniridia, anomalia genitourinária e retardo mental), Denus-Drash, Beckwith-Wiedemann (SBW) e Nefroblastoma familiar (17q12-21 e 19q13.3-13.4). Apesar do bom prognóstico na maioria dos casos, muitos pacientes, mesmo sendo diagnosticados com histopatológicos favoráveis, apresentam recidivas e evoluem

para óbito. Assim, há uma necessidade de pesquisas no campo da identificação de fatores prognósticos que apontem para possibilidades terapêuticas ainda não exploradas, como nos estudos dos fatores de angiogênese tumoral. A presente pesquisa tem como objetivo estudar no Tumor de Wilms o Fator Tecidual (*Tissue Factor*, TF) ou FT, uma proteína angiogênica e coagulogênica, através da análise de sua expressão diferencial, utilizando a técnica de quantificação do RNA mensageiro (RNAm) através da Reação em cadeia da DNA Polimerase associada à fluorescência (PCR em tempo real).

A presente investigação se fundamentou nos resultados anteriormente apresentado por Maciel et al (1), que através de estudo imunohistoquímica do FT no TW e na densidade microvascular (DMV), observou que 48,8% dos casos os avaliados apresentaram intensa expressão do FT em células tumorais e 31,7% com expressão moderada. Justifica-se, assim, a continuidade de tal estudo com a avaliação quantitativa da expressão de RNAm de FT nessas amostras empregando ferramentas de biologia molecular, a fim de identificar fatores prognósticos mais efetivos para essa patologia maligna. Ademais, usa o aprimoramento em técnicas de estudo e pesquisa no laboratório de anatomia-patológica através da patologia molecular, buscando viabilizar tais técnicas para um atendimento melhor e mais eficaz dos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tumor de Wilms

O nefroblastoma ou Tumor de Wilms (TW) é a principal neoplasia maligna renal pediátrica. Foi classificada como um tumor misto, pelo cirurgião alemão Max Wilms (1899). Essa enfermidade afeta 1 em cada 10.000 sendo considerada uma das mais frequente neoplasias malignas sólidas da infância (4) (9). Com incidência anual de 8,1 casos por um milhão de indivíduos. Com 650 casos por ano na América do Norte, é o tumor renal maligno mais comum em crianças e o quarto câncer em incidência na infância (10, 11).

Tumores pediátricos renais representam um grupo relativamente comum de tumores da infância, em que ambos, diagnóstico e tratamento, são altamente dependentes do exame histopatológico (12). O TW é um tumor infantil que está intimamente ligado ao desenvolvimento precoce renal (13).

Até 1930, a perspectiva de sobrevida para as crianças com tal patologia era de aproximadamente 30%. Terapias multidisciplinares e pesquisas multi-institucionais de ensaios clínicos melhoraram substancialmente a sobrevivência deste pacientes, passando para cerca de 90% na sobrevida (14) com o uso de quimioterapia e radioterapia (11). A criança, após uso dessa terapia oncológica, pode sofrer sequelas desse tratamento no decorrer de sua vida. Como a persistência dos efeitos colaterais agudos (pancitopenia, enterite, cistite, hemorragias e septicemia) e tardios advindos dessas terapias. Esses efeitos tardios podem incluir: ausência de crescimento e desenvolvimento normais; atraso no amadurecimento ou mau-funcionamento dos órgãos como pulmões, fígado, coração e outros; infertilidade e retardo mental; dificuldades de gestação e uma segunda neoplasia maligna (9, 15, 16)

O TW tem dois importantes fatores de associação ao prognóstico, o estadiamento (envolvimento linfonodal e a ruptura tumoral) e a histopatologia

(11). Por estas razões, o desenvolvimento de novas vias terapêuticas para o tratamento do TW se torna relevante bem como a identificação de outros fatores prognósticos e predictivo que permitam uma maior individualização do tratamento dos pacientes, o monitoriamento da atividade tumoral e a redução segura do emprego da radioterapia e quimioterapia nos casos favoráveis.

2.1.1 Etiologia

Ainda se conhece pouco sobre o mecanismo que atua na predisposição da mudança epigenética e germinativas, que leva à evolução e progressão dos tumores malignos. Os fenótipos oncológicos podem ser dependentes da célula de origem do tumor primário, da mudança epigenética em si ou da acumulação sequencial de mutações genéticas múltiplas (17).

Critérios epidemiológicos para distinguir os tumores de acordo com a patogênese incluem a idade do diagnóstico, gênero, etnia e peso ao nascer. Além dos fatores fisiopatológicos iniciadores de tumor no início da vida, há os eventos congênitos que podem ser candidatos plausíveis às explicações da sua etiologia. Dessa forma, 80% dos casos são diagnosticados antes de cinco anos idade (18, 19).

Devido à natureza das células malignas, a caracterização da origem celular do câncer é importante para melhorar o desenvolvimento e direcionamento das terapias específicas para cada subtipo celular. A histologia do tumor é influenciada pela predisposição de mudanças epigenéticas ou tipos de células precursoras que ocorrem durante a embriogênese (20). Como consequência, os portadores de TW tendem a ter peso elevado no nascimento e lesões precursoras do tumor (restos nefrogênicos) (17, 21).

Considerava-se que a patogênese do TW era semelhante às dos retinoblastomas, que seguem um modelo de herança de gene único (*modelo two-hit*). Entanto, já se conclui que o TW possui uma patogênese complexa e

heterogênia. Pelo menos dez genes tem sido implicados no seu desenvolvimento, a maioria dos quais está associada à herança familiar ou malformações síndrômicas, que afetam apenas uma pequena fração dos casos (22, 23). Deleção constitucional do gene do Tumor de Wilms-1 (*WT1*), no cromossomo 11p13, está bem associada com a síndrome WAGR (tumor de Wilms, aniridia, anomalia genitourinária e retardo mental), enquanto que, mutações germinativas *missenses* (codificação de um aminoácido diferente do normal) no *WT1* são responsáveis pela maioria dos TW que ocorrem como parte da Síndrome de Denys-Drash (disgenesia gonadal ou pseudo-hermafroditismo masculino, doença degenerativa renal- glomerulonefrite ou síndrome nefrótica e 90% de risco de TW) (18, 24, 25). O distúrbio regulatório da expressão em genes do cromossomo 11p15.5, particularmente quando ocorre a perda de heterozigose (*loss-of-imprinting-LOI*) no gene *IGF2* (*fator de crescimento de insulina-2*), ocorre em uma grande parcela de casos TW (18, 26, 27). Entretanto, essa relação entre alterações do *WT-1* e TW é mais associada em casos síndrômicos, enquanto, somente 1/3 de todos TW não-síndrômicos apresentam deleção nesse loco gênico e apenas 10% mutação (25).

Os restos nefrogênicos (RN) são lesões focais, sequelas de erros no desenvolvimento renal que normalmente se associam às epimutações e distinguem o TW de acordo com a sua patogênese. Esses RN podem ser precursores para o TW, pois já foram encontrados em rins com tais restos (17). Esses restos são classificados como Resto nefrogênico intralobar (RNI) e como Resto nefrogênico perilobar (RNP). O RNI (*ILNR-Intralobar nephrogenic rest*), que ocorre de forma isolada no interior do lóbulo renal, no seio renal ou nas paredes coletoras, estando associado com as síndromes de WAGR, de Denys-Drash e com anomalias genitourinárias (28, 29). O RNP (*PLNR- Perilobar nephogenic rests*), que ocorre na periferia do lóbulo renal e são frequentemente encontrados em múltiplos focos, está associado à síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) e hemi-hipertrofia (HH). A maioria dos TW é do tipo histológico trifásico (blastema-epitelial-estroma). O componente estromal tende a predominar em tumores

associados ao RNI, enquanto que, os componentes blastematoso ou epitelial são associados com o RNP (18).

Trabalhos recentes tem associado observações moleculares, microscópicas e epidemiológicas na tentativa de identificar biologicamente subgrupos do TW que poderiam apresentar alvos distintos para intervenções terapêuticas (22). Schumacher *et al* (30) propõem que a mutação no *WT1* serviria como identificação de um subgrupo de pacientes com histologia predominante estromal, associação com RNI e má resposta à terapia. Como a maioria dos TW ocorre na ausência aparente de restos nefrogênicos, espera-se que tais critérios moleculares possam facilitar a sua classificação em subgrupos distintos em relação à etiologia, à patogênese e ao prognóstico. Tal classificação molecular poderá auxiliar na compreensão das variações e associações entre as características microscópicas dos restos nefrogênicos e histologia tumoral, e das características epidemiológicas (18).

Originalmente identificado como gene supressor de TW (31), o *WT-1* codifica um fator de transcrição com quatro domínios “dedo de zinco” (*zinc-finger*), que são necessários para o desenvolvimento embrionário do rim (32, 33). O *WT-1* está localizado no cromossomo humano 11p13; a perda da heterozigose nesse locus está associada com o tumor renal embrionário (tumor de Wilms) e malformações urogenitais (34). Tem sido relacionados altos níveis de expressão da *Pax-2* ao TW, entretando, o gene *Pax-2* tem sua expressão regulada pelo gene *WT-1* (35, 36).

Estudos encontraram uma forte correlação entre o peso no nascimento, a idade do diagnóstico, as anomalias congênitas, as lesões precursoras (RNI e RNP) e a histologia do TW, que fornecem evidências adicionais à heterogeneidade da patogênese tumoral. Eles sugerem uma possível base biológica para o ligeiro excesso de peso e das idades mais avançadas entre meninas, em comparação com os meninos com TW (18, 19, 29).

A associação entre o alto peso no nascimento e o aumento do risco de TW é estimada em 4-10% dos casos. Nota-se que tal fato pode estar ligado às anomalias genéticas e epigenéticas no gene *IGF2* em TW. Embora múltiplos

fatores influenciem o peso ao nascer, incluindo a nutrição e saúde materna e idade gestacional (18, 37-39).

Atenção às exposições ambientais no início da gravidez e no período pós-natal se justifica devido à importância do diagnóstico precoce de TW (8). Observa-se uma importante associação clínica entre a história de hipertensão materna e um aumento do risco de TW. A hipertensão é um fator de risco conhecido para o carcinoma de células renais em adultos, mas não tem sido consistentemente demonstrado estar associado com o risco de TW na infância (40). Na Análise de Chu *et al*, os dados sugerem uma estimativa de 1,2% dos casos de TW são atribuíveis a uma história materna de hipertensão (8).

A contribuição dos riscos de pesticidas para o risco de câncer é biologicamente plausível, há evidências no aumento do risco para alguns tipos de neoplasias malignas infantis, quando ocorre a exposição dos pais. Revisões de literatura sugerem uma associação entre a exposição aos agrotóxicos e o desenvolvimento da TW, bem como da leucemia infantil, tumores cerebrais, neuroblastoma e sarcoma de Ewing (41, 42).

2.1.2 Epidemiologia

Os tumores sólidos pediátricos representam cerca de 60% de todas as neoplasias malignas pediátricas. Composto pelos grupos de tumores cerebrais (30%), neuroblastoma (15%), sarcomas de tecidos moles, incluindo rabdomyossarcoma (10%), tumor de Wilms (10%), tumores ósseos, incluindo osteossarcoma e sarcoma de Ewing (8%), retinoblastoma (5%) e tumores diversos, incluindo o hepatoblastoma, tumores de células germinativas e melanoma (17%) (43).

Tumores malignos sólidos pediátricos tem melhores resultados de sobrevida comparados com os tumores malignos dos adultos (44). No entanto, o prognóstico continua sombrio para pacientes com metástase de tais tumores

pediátricos, apesar das terapias agressivas (quimioterapia e radioterapia) associadas à cirurgia. Novas abordagens terapêuticas são necessárias para um melhor prognóstico e diagnóstico mais precoce nessa população pediátrica (45).

O tumor de Wilms é a neoplasia maligna primária de rim mais comum na infância, em todas as regiões do mundo, representando 85% de todos os tumores renais dessa fase (9). Na população européia, totaliza 97% das neoplasias malignas de rim (46, 47). É o segundo tumor sólido da infância em frequência, afetando principalmente crianças com idades entre um e quatro anos, com média de três anos (48, 49). Em casuísticas brasileiras, há uma incidência de 10 casos por um milhão de habitantes para o sexo masculino e de 13 por milhão de habitantes para o sexo feminino (50). Entre os 176 casos registrados no primeiro estudo do Grupo Cooperativo Brasileiro para o Tratamento do Tumor de Wilms (GCBTTW), a idade média para o gênero masculino foi de 37 meses e para o gênero feminino de 46 meses; quanto à raça foi de 39,5 meses para a branca e de 46,1 meses para não-branca (51). No GCBTTW a idade variou de 15 dias a 22 anos, com uma mediana de 36 meses, média de 44,9 meses e desvio padrão de 36,6 meses (29,32). Setenta e cinco por cento dos pacientes estão abaixo de cinco anos e 90% abaixo de sete anos, sendo o TW raro no recém-nascido e no adulto (48, 49, 51). Analisando os gêneros, o GCBTTW, encontrou uma igualdade nas taxas de acometimento desse tumor e a raça predominante foi a branca, com 66,6% (52-54).

Em um estudo epidemiológico brasileiro com 132 casos de TW unilateral em menores de 15 anos de idade (46), estimou-se 84,6% de sobrevida global em cinco anos. As probabilidades de sobrevida para os estádios I, II, III e IV foram de 100%, 94,2%, 83,2% e 31,3%, respectivamente. A taxa de sobrevida para os pacientes com histologia favorável foi de 89,4%, para aqueles com anaplasia focal 66,7 % e com anaplasia difusa 40%. Todos os pacientes com doença em estágio IV e anaplasia difusa foram a óbito. Todos os pacientes com doença em estágio I, independente da histologia, permaneceram vivos até o final do período de seguimento. A idade ao diagnóstico mereceu atenção: pacientes com mais de 48 meses de idade apresentaram maior frequência de doença III e IV. Essa maior

frequência de estádios avançados nesses pacientes poderia ser explicada, em parte, pelo atraso no diagnóstico. Estudo do NWTS4 mostrou que crianças maiores de 48 meses a idade ao diagnóstico tinham maior probabilidade de recidiva da doença e morte, atribuíram esta associação ao atraso no diagnóstico, mais frequentemente observado nessas crianças (47).

Dados obtidos da Sociedade Internacional de Oncologia Pediátrica (*International Society of Paediatric Oncology-SIOP*) e do Grupo de Estudo Nacional de Tumor de Wilms (*National Wilms Tumor Study-NWTS*) mostram que pacientes do gênero feminino são em média seis meses mais velhos do que os do gênero masculino, e os de raça negra são significativamente mais velhos do que os da raça branca e os asiáticos (48, 49). A taxa mais alta é observada na população de afroamericanos dos Estados Unidos da América (EUA) e as taxas mais baixas estão entre os asiáticos em Shangai, Filipinas e Japão, resultando em variação na incidência de até três vezes entre essas regiões (55).

Vários ensaios clínicos tem sido desenvolvidos por pesquisadores nos Estados Unidos, pelo *National Wilms' Tumor Study Group* (NWTSG), desde 1969; na Europa pelo *Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique* (SIOP), desde 1971 (56); no Reino Unido pelo *United Kingdom Childrens Cancer Group* (UKCCG), (57) desde 1980 e, no Brasil, pelo Grupo Cooperativo Brasileiro para Tratamento do Tumor de Wilms (GCBTTW), desde 1986 (58). Devido aos avanços terapêuticos obtidos por esses grupos cooperativos, o prognóstico dos pacientes com tumores com histologia favorável tem melhorado sensivelmente nas últimas décadas, alcançando taxas de sobrevida de 90% em quatro anos (56). Os estudos do SIOP (59) e do NWTS10 encontraram sobrevida de 92% e 96% em cinco anos e dois anos, respectivamente. Porém, esses resultados se referem a pacientes selecionados, pois o primeiro grupo só analisou tumores com histologia favorável (HF), enquanto o segundo excluiu pacientes com estágio IV (47, 56, 59).

O estudo brasileiro conduzido pelo GCBTTW mostrou que, para 602 pacientes avaliáveis com estágio I a IV e histologia favorável (HF), a sobrevida global foi de 80% e 73% aos dois anos e quatro anos, respectivamente (47, 58) e os resultados do estudo do SIOP aparecem na Tabela 1 (60).

TABELA 1. Sobrevida do tumor de Wilms do SIOP-9.

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

N0= sem envolvimento de linfonodo, N1= com envolvimento de linfonodo
 Fonte: Graf N, Tournade MF, Kraker J. Urol Clin N Am 27(3): p 443-54, 2000

Um estudo conduzido pelo Grupo de Estudo Nacional de Tumor de Wilms (*National Wilms Tumor Study Group- NWTG*) apresentou que, combinando a cirurgia com quimioterapia pós-nefrectomia, a sobrevida livre de recidiva por 8 anos foi dentro do intervalo de 90,5% a 98,9% para o estágio I; 73,4% a 88,7% no estágio II e III e 45,0% a 57,1%, para o estágio IV, demonstrando a importância da detecção precoce para o tratamento do TW (61, 62). O tratamento recomendado é realizado por uma equipe de oncologia que trabalha em conjunto com as áreas de cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Esse trabalho em equipe multidisciplinar vem se apresentando, através de ensaios clínicos, como o principal responsável pelo notável progresso feito na área da oncologia pediátrica nos últimos 50 anos (63, 64). A sobrevida global em 5 anos, para crianças com câncer, foi inferior a 20%, em 1950. Atualmente é de 75-80% (9, 64).

Os grupos NWTSG e SIOP tem adotado, em linhas gerais, abordagens terapêuticas diferentes para os pacientes com TW. O NWTG recomenda a nefrectomia prévia a qualquer outro tipo de tratamento, ao passo que a SIOP recomenda o inverso, ou seja, quimioterapia prévia à nefrectomia. No entanto, ambas as abordagens tem alcançado excelentes resultados, que são similares para a maioria dos pacientes (47, 56, 65).

2.1.3 Aspectos histopatológicos do Tumor de Wilms

Histologicamente, o TW mimetiza diversas fases da nefrogênese, apresentando diferenciações aberrantes da célula multipotente mesenquimal renal. No entanto, o TW responde positivamente ao tratamento oncológico pediátrico, com uma taxa global de cura de mais de 85% (66).

Os TW são multicêntricos na sua maioria, entretanto massas multicêntricas em um rim e lesões primárias bilaterais são observadas em 7% dos casos. Esse tumor tem, usualmente, massas arredondadas bem demarcadas do parênquima renal adjacente através de uma pseudocápsula fibrosa peritumoral. Apresentam cor que varia de cinza claro até intenso e com consistência elástica, tornando-se mais firme nas lesões compostas em sua maioria por elementos estromais maduros (25). O clássico tumor de Wilms é composto de blastema, estroma e elementos epiteliais (trifásico), podendo ainda apresentar dois componentes (bifásico) ou apenas um deles, com ou sem anaplasia (25, 67). As células do blastema são pequenas, indiferenciadas e com atividade mitótica; estas células podem ocorrer de modo difuso com a perda da aderência celular e um padrão agressivo com invasão adjacente dos vasos e tecidos conjuntivos, em contraste com as características típicas bem circunscritas, encapsuladas e bordo delimitado da maioria dos TW. O padrão blastematoso nodular ou em serpentina é caracterizado por cordões de um estroma frouxo envolvendo as células de blastema. O componente epitelial de diferenciação está presente na maioria dos TW, este padrão se manifesta por estruturas primitivas que são reconhecidas como formas dos túbulos precoces ou células de elementos papilares ou tubulares em vários estágios da nefrogênese normal. O padrão estromal pode ocorrer e dificulta sua identificação quando a diferenciação epitelial ou blastematosa estão ausentes (25, 67).

Existem duas formas histológicas de TW, os chamados favoráveis, que tem um melhor prognóstico e a forma anaplásica, que é mais resistente à quimioterapia e radioterapia (9). O padrão histológico prevalente é a histologia

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

A histologia favorável se assemelha ao desenvolvimento de um rim normal, consistindo dos três componentes: blastema, epitelial (túbulos) e estroma. Não apresentando anaplasia, o tipo blastematoso indica o pior prognóstico em relação ao epitelial, com uma recidiva mais frequente (49, 68). Enquanto isto, a histologia desfavorável apresenta células anaplásicas, focais ou difusas e núcleos hiper cromáticos, sendo que muitas vezes apresenta mitoses multipolares. A anaplasia focal parece conferir um melhor prognóstico do que a anaplasia difusa. A anaplasia (pleomorfismo celular e atipia difusa) está associada mais com resistência à quimioterapia, que pode ser detectada após a quimioterapia pré-operatória sem resposta (49, 69) do que com agressividade (25). O mais importante fator preditor histológico do TW para resposta ao tratamento e sobrevida é a presença ou ausência de anaplasia (66).

2.1.4 Classificação

O Tumor de Wilms clássico, classificado tradicionalmente ao diagnóstico como de histologia favorável, é composto por três tipos de células: blastematoso, epitelial e estromal, que podem estar presentes em proporções variáveis (54).

A administração quimioterápica pré-operatória induz alterações histológicas que, de acordo com estudos do SIOP, permitem inferir sobre a resposta ao tratamento e apresentam, portanto, implicação prognóstica (70). As mudanças após quimioterapia incluem necrose, fibrose, depósitos de hemossiderina, maturação dos componentes do blastema, epiteliais e estromais, com músculos estriados aparecendo com maior frequência. Uma resposta excelente à quimioterapia pode levar à necrose completa em alguns tumores, enquanto que outros, sem resposta ao tratamento, tem pior prognóstico (25, 67). A SIOP se

baseou na correlação entre achados histológicos e a sobrevida dos pacientes, classificando os tumores renais como: baixo risco, risco intermediário e alto risco (Tabela 2) (28, 53, 71). O nefroma mesoblástico, o sarcoma de células claras e o tumor rabdóide representam entidades à parte do TW devido as suas características clínicas e histológicas diferentes, mas foram incluídos na classificação da SIOP por serem tumores típicos da infância (69). Ao lado da anaplasia três outros tipos foram incluídos devido ao resultado do tratamento, são eles: o nefroblastoma completamente necrótico (baixo risco), o nefroblastoma com predomínio blastematoso (alto risco) e outros de risco intermediário (como o nefroblastoma regressivo) (25, 52).

TABELA 2. Classificação dos tumores renais SIOP-9

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

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

Para avaliação das peças histológicas pela classificação da SIOP-9 é necessário utilizar o porcentual de necrose e o elemento predominante, sendo o tumor considerado como misto quando não houver predominância de nenhum dos tipos, conforme organograma abaixo (Figura 1).

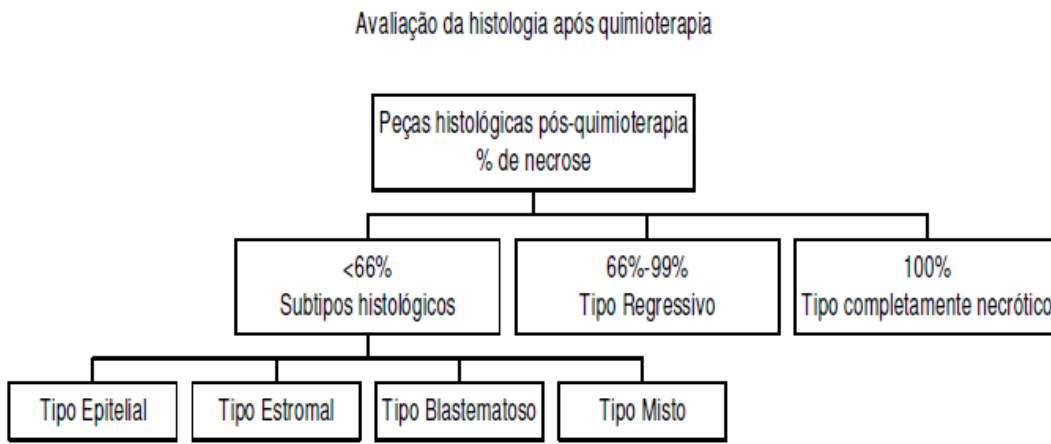


FIGURA 1. Organograma utilizado pelo SIOP-9.

2.1.5 Estadiamento

O prognóstico do pacientes depende essencialmente do estadiamento e da histologia do TW. Este é, ainda, um dos critérios mais importantes para o tratamento, mas sua acurácia ainda é um grande problema. O estadiamento clínico é determinado pelo cirurgião pediátrico durante a cirurgia e deve ser confirmado pelo patologista (1).

O estadiamento, que é baseado no grau de extensão macro ou microscópico, é o mesmo para tumores com HF ou HD. Por esse motivo, os pacientes devem ser caracterizados por ambos os critérios (por exemplo: estágio II, histologia favorável ou estágio II, histologia desfavorável). As descrições mais utilizadas no estadiamento descritas pelos NWTS-3 (55, 72) e pelo SIOP-9 (53, 69) que diferem pouco, mas a descrição do SIOP acrescenta os dados que podem ser encontrados com o uso da quimioterapia pré-operatória.

TABELA 3. Estadiamento do Tumor de Wilms.

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

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

2.2 Fatores prognósticos oncológicos

A transformação oncogênica e diferenciação celular maligna são consideradas como os principais processos da malignização. Produzem populações celulares heterogêneas, incluindo subconjuntos de células iniciadoras de tumor (CIT; *tumour initiating cells, TICs*), também conhecidas como células-

tronco cancerosas (CTC; *cancer stem cells*, CSCS). Eventos intracelulares envolvidos nestas mudanças tem fundamental papel nos componentes extracelulares e sistêmicos da progressão do câncer, incluindo aqueles que dependem do sistema vascular. Isso inclui a angiogênese, vasculogênese ativação do sistema de coagulação e formação de CTC e nichos pré-metastáticos (73).

A inter-relação entre os complexos processos de angiogênese, inflamação e coagulação está ligada à iniciação e ao desenvolvimento do câncer. Além de outros mecanismos, o microambiente inflamatório determinado pelas células, composto por uma variedade de citocinas, quimiocinas e enzimas, pode levar a iniciação e promoção tumoral (74).

Ainda que os processos genéticos tenham sido tradicionalmente observados como intrínsecos às células malignas, atualmente se reconhece que esse efeito ultrapassa os limites celulares do tumor e que tais mudanças oncogênicas em algumas células tumorais afetam células malignas adjacentes, modificando vários controles sistêmicos da homeostase tecidual (75). Alguns desses processos são mais importantes nas interações intercelulares oncogênicas que envolvem as várias facetas do sistema vascular, como alvos, efetores ou etapas do crescimento das células malignas e sua disseminação. Esses efeitos vasculares podem envolver interações de curto, médio e longo prazo, os quais podem envolver não somente estroma, endotélio e células inflamatórias, mas também a coagulação e o sistema fibrinolítico (73, 75).

Sinais de doenças crônicas inflamatórias estão presentes em, praticamente todos os tumores malignos, independentemente da existência de doença prévias, infecciosas ou inflamatórias. A ativação oncogênica, induzida por fatores de transcrição, desencadeia a produção de citocinas pró-oncológicas. A ativação dos fatores de transcrição no estroma, nas células inflamatórias e tumorais, induz a liberação de mediadores que estimulam a proliferação celular, migração, sobrevivência e angiogênese (76).

O microambiente tumoral é um conjunto composto por moléculas da matriz extracelular, células tumorais, células endoteliais, fibroblastos e células do sistema

imunológico. O crescimento tumoral e a formação de metástases são dependentes da angiogênese tumoral. A matriz extracelular e a membrana basal liberam inibidores endógenos da angiogênese, como a endostatina. Por outro lado, algumas moléculas da matriz extracelular podem promover a angiogênese através da estabilização dos vasos sanguíneos e da associação com fatores de crescimento pró-angiogênicos. Por exemplo, a maioria das células do estroma em carcinomas são os fibroblastos. Esses associados ao carcinoma mostram um fenótipo distinto ao dos fibroblastos normais. Os mecanismos dessa associação entre o tumor e os fibroblastos, que regulam a angiogênese, ainda não são totalmente conhecidos, mas são sugeridos como uma importante fonte de fatores de crescimento e citocinas recrutadoras de células endoteliais. As células do sistema imunológico, macrófagos e neutrófilos são outra fonte de regulação da angiogênese, através de quimiocinas, fatores de crescimento e proteases. O microambiente tumoral é um complexo desorganizado de vários tipos de tecidos, células e matriz extracelular que podem regular a iniciação e manutenção da angiogênese patológica (77).

Diversos marcadores moleculares tem sido investigados como possíveis indicadores do comportamento biológico de tumores, porém sem uma concordância entre autores sobre quais marcadores seriam preditivos de prognóstico. O processo de metástase é o resultado da modificação nas propriedades das células neoplásicas e sua interação com outras células. Para desenvolver uma metástase, a célula prolifera, perde contato com as células vizinhas, migra através da matriz intersticial, invade vasos sanguíneos e linfáticos e se multiplica em linfonodos e órgãos distantes. As células metastáticas apresentam características para exercer esta ação que são determinadas por modificações de seus genes. O conhecimento destas propriedades moleculares da célula neoplásica procura identificar o potencial de gerar metástase regional (78).

A angiogênese é o crescimento de novos capilares, a partir de vasos já existentes, sendo uma etapa essencial no desenvolvimento de neoplasias. Os capilares são formados no estroma de um tumor a partir de células endoteliais do

hospedeiro. Isto permite o crescimento do tumor além de 2-3 mm, através da efusão de oxigênio e nutrientes, remoção de metabólitos tóxicos, ao invés de simples difusão no espaço extracelular que manteria o tumor restrito e com uma pequena população celular (79, 80). Evidências experimentais demonstram que a angiogênese também contribui com o processo metastático, pois à medida que há expansão da vascularização, maior é a superfície para o escape de células tumorais na circulação, o que também pode ser facilitado pela imaturidade dos vasos formados (79). O papel da angiogênese na progressão do tumor primário, sua associação com metástases hematogênicas e sobrevida tem sido extensamente estudado, principalmente em tumores de mama, pulmão, trato gastrointestinal e genitourinário, demonstrando associação estatisticamente significativa entre a intensa neovascularização e pior prognóstico (81).

Em algum ponto do desenvolvimento da maioria das neoplasias malignas humanas, suas células saem dessa massa tumoral primária, invadem tecidos e os sistemas circulatórios sanguíneo e linfático, indo para locais distantes, onde extravasam e inicializam novas colônias tumorais, as metástases. As metástases são a causa de cerca de 90% das mortes por câncer nos humanos. Durante a invasão e metástase, ocorre o acoplamento físico entre as células malignas e mudanças microambientais nessas lojas tumorais. As células metastáticas rompem várias barreiras físicas que consistem em membrana basal, matriz extracelular e camadas de células fortemente associadas. Especula-se que a membrana basal dos vasos sanguíneos do tumor pode ser incompleta ou ausente, permitindo assim uma rota mais fácil para as células cancerosas iniciarem sua metástase (77).

Além da angiogênese, a hipóxia e a linfangiogênese tem sido associadas ao processo de disseminação e metástases de tumores primários (82, 83). Ainda não está esclarecido se existem diferenças em hipóxia e angiogênese entre diferentes sítios metastáticos e quais seriam os mecanismos de tais diferenças. Comparações de perfis de expressão gênica entre tumores primários de mama e metástases de diferentes locais revelam que as metástases são muito semelhantes às do tumor primário (84, 85), sugerindo que a influência do

microambiente tumoral local do sítio metastático é menos importante do que a biologia celular do tumor primário. Além disso, as células endoteliais em diferentes órgãos e leitos vasculares possuem heterogeneidade estrutural e funcional considerável. Os padrões de expressões gênicas entre as células endoteliais dos vasos maiores e células endoteliais microvasculares, assim como as células endoteliais de diferentes órgãos, são intrinsecamente diferentes (86). As diferenças de tecidos específicos em células endoteliais podem ser devidas às diferenças no microambiente do tecido, ou seja, através de distintos fatores solúveis, célula célula e célula matriz (87). Certos tipos de tumores humanos criam um microambiente favorável para instalação do nicho metastático, através da produção de uma nova proteína que, especificamente, reprime a trombospondina-1 no tecido estromal adjacente, favorecendo, assim, o posterior processo de disseminação tumoral. O mecanismo da formação do nicho metastático ainda não está esclarecido, mas, provavelmente há indicativos de conexões entre a metástase e angiogênese. Este mecanismo provavelmente pode facilitar o início da angiogênese tumoral metastática (77, 88).

O uso de marcadores biológicos moleculares pode contribuir para o conhecimento do prognóstico no estudo histológico das lesões, nos protocolos de tratamentos e avaliar a resposta a agentes terapêuticos (89). A compreensão dos processos moleculares no TW deverá contribuir para o tratamento e também para a detecção de novos tumores.

2.3 Angiogênese tumoral: fisiopatologia e importância clínico-patológica

O termo angiogênese foi utilizado pela primeira vez em 1935 por Hertig para descrever a vascularização na placenta. O estudo sistemático da angiogênese teve início com Judah Folkman e progressivamente foram desenvolvidos vários modelos *in vitro* e *in vivo* para o estudo de seus mecanismos moleculares, modulação e a sua importância nos processos fisiológicos e patológicos (73). Com os estudos pioneiros de Folkman (90), analisou-se o 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 necropsia é significativamente maior do que a de tumores malignos invasores, especialmente nas lesões de mama, tireóide e próstata, indica que a ocorrência de disseminação sistêmica é um evento relativamente infrequente (90). A incapacidade de progredir como lesão neoplásica, segundo Folkmann, reside no fato de que tumores *in situ* não adquiriram um fenótipo angiogênico que possibilitasse seu crescimento (90).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no crescimento vascular diferem nos vários tecidos. Dessa forma, os neovasos terão aspectos morfológicos e funcionais de acordo com as necessidades de cada tecido. Essa heterogeneidade das células endoteliais é determinada pela expressão e atividade de fatores angiogênicos (p.ex. VEGF, Angiopoetina (Ang)-1) que variam amplamente em diferentes tecidos e por fatores angiogênicos órgão-específicos que determinam a alteração angiogênica, mas de modo específico para os diferentes órgãos (91, 92).

Em circunstâncias normais a formação de novos vasos sanguíneos ocorre durante a cicatrização de lesões, regeneração de órgãos, no sistema reprodutor feminino, na maturação do folículo ovariano, na formação do corpo lúteo, na regeneração do endométrio após o ciclo menstrual, na implantação do ovo e na formação da placenta. A angiogênese também é um fator importante em vários processos patológicos, como no crescimento e metástase de tumores, na artrite reumatóide, na retinopatia diabética, entre outros (92-94).

A indução de vasos sanguíneos na massa tumoral é um fenômeno complexo que envolve uma multiplicidade de fatores. O estímulo para a angiogênese tumoral é produzido diretamente pelas próprias células neoplásicas, em menor grau e indiretamente pelas células inflamatórias recrutadas no sítio do tumor. Esses vasos tumorais são caracterizados por apresentar uma organização caótica, diâmetros variados, são tortuosos, fenestrados, possuem membrana basal descontínua, padrão anormal de crescimento, ausência de inervação e

ausência de células murais ou associação anormal entre as células endoteliais e murais (95).

Tumorigênese é um processo de várias etapas complexas de alterações que conduzem à progressiva transformação de células normais em malignas. No entanto, o crescimento tumoral não é apenas determinado por suas próprias células, como também por vários tipos de outras células e pela matriz extracelular (MEC) do microambiente tumoral que também podem afetar o seu desenvolvimento (96). Enquanto, angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos pré-existentes e um dos principais eventos para progressão tumoral. Além de fornecer suporte estrutural e funcional, a matriz extracelular pode modular comportamento vascular das células endoteliais. A MEC é uma rica fonte de inibidores da angiogênese e um local de armazenamento para promotores angiogênicos. Em condições fisiológicas, inibidores angiogênicos podem neutralizar a atividade dos promotores angiogênicos, mantendo assim a angiogênese em equilíbrio. Durante os eventos patológicos tumorais, a progressão do câncer é dependente de sua neoangiogênese (97). Os dados disponíveis indicam que diferentes tipos de células tumorais usam diferentes estratégias moleculares para ativar a iniciação angiogênica. Isto levanta a questão se uma única terapia anti-angiogênica será suficiente para tratar todos os tipos de tumor, ou se um coquetel de tais terapêuticas precisa ser desenvolvido, cada um respondendo a um programa distinto de angiogênese (77).

O sistema vascular é muito heterogêneo em diferentes órgãos e tecidos. O microambiente específico de cada órgão pode contribuir diretamente para a manutenção e indução de fatores angiogênicos (98). Tem sido demonstrado que o fenótipo dos vasos associados ao tumor é diferente de ambos os vasos normais e não-associados à angiogênese tumoral. A expressão de diversas moléculas de adesão, tais como E-selectina e VE-caderina, é perdida ou diminuída nos vasos tumorais (99). Enquanto, outras são superexpressas, como a integrina alfaVbeta-3 (99) e membros da família heparina sulfato proteoglicano CD44 (100). Assim, parece possível especificar o alvo da terapia antiangiogênica para a vascularização tumoral, sem quaisquer efeitos nocivos sobre a vasculatura

fisiológica. O modo predominante de ação dos agentes antiangiogênicos clinicamente testado até a data tem sido citostáticos, em que a inibição da vascularização do tumor provoca estagnação tumoral. A constatação de que muitos desses agentes citostáticos apresentaram reversibilidade de sua atividade após remoção do agente e que a velocidade de crescimento vascular em tumores volta a seu normal, após a cessação do tratamento é, portanto, de elevada relevância clínica. Demonstrou-se que rapidamente a neovascularização tumoral se reinicia após a retirada da terapia anti-VEGF. Um dia após a retirada dessa droga, brotos endoteliais começaram a crescer nas margens vazias de membrana basal que não foram destruídas pelo tratamento antiangiogênico. Além disso, também, pericitos sobreviveram ao tratamento. Isto sugere que a terapia antiangiogênica poderia ser mais eficaz se pericitos e as margens da membrana basal pudessem ser alvo conjuntamente (101).

A teoria de desenvolvimento tumoral de Folkman se baseia em vários aspectos. Inicialmente, a maioria das lesões apresenta uma fase de aparente inatividade proliferativa associada a um estágio praticamente avascular (90),(102). A nutrição dessas células depende principalmente da difusão de nutrientes pelos tecidos adjacentes, o que limita seu tamanho a aproximadamente 1 ou 2 mm (90, 102). 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 (90, 102). 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 (102). 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) (102). O câncer não seria, portanto, erradicado, mas teria uma regressão sustentada enquanto o bloqueio angiogênico

fosse mantido (102). Essas 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 *et al* (103) em amostras de um condrossarcoma, tendo sido chamado fator básico de crescimento de fibroblastos. Apesar de seu uso em modelos experimentais haver resultado no crescimento de capilares sanguíneos, essa 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 (104). O VEGF é possivelmente o mais potente agente angiogênico conhecido (105). Sua presença aumenta a permeabilidade vascular e constitui um importante estímulo para a mitose de células endoteliais (102, 105, 106). Em situações de hipóxia, é possível observar um aumento significativo dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) para VEGF, bem como da proteína resultante (102, 105, 106).

Fatores de crescimento endotelial vascular, particularmente VEGF-A, são provavelmente os mais potentes fatores pró-angiogênicos descritos até o momento. Assim, uma série de investigações tem incidido sobre os membros da família VEGF e seus receptores VEGFR-1, -2 e -3, na progressão do câncer. O VEGF é secretado pelas células do tumor e se liga aos seus receptores VEGF-R2 e neuropilina na superfície das células endoteliais (88). Ao se ligar no receptor-VEGF, na superfície das células endoteliais, o VEGF-A pode induzir extravasamento vascular, proliferação e migração de células endoteliais (107). Os brotos de crescimento vascular são guiados por um gradiente de VEGF (108). Alguns estudos analisaram a relação entre fatores angiogênicos e a densidade microvascular (DMV). Em tumores de cabeça e pescoço, os estudos apresentam resultados conflitantes: Cantu de Leon *et al* (109), 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 *et al* (110) 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 paratireóideo e cálcio. Brieger *et al* (111), 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 *et al* (112) 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, mais elevada em hiperplasias com atipias significativas e adenocarcinomas. Em neoplasias de ovário, por outro lado, Sonmezer *et al* (113) 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 imunoistoquímica para VEGF e a DMV nesses tumores.

Em carcinomas de esôfago, Du *et al* (114) 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 *et al* (115), 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 *et al* (116) 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 *et al* (114) observaram que 67,5% dos adenocarcinomas de estômago expressavam VEGF, sendo a contagem microvascular nessas 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 *et al* (117), 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 nesse último tipo de tumor, enquanto que as lesões de crescimento superficial apresentavam fraco padrão de neovascularização. Por fim, Tsujitani *et al* (118) 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 DMV foi maior naqueles casos em que o VEGF tinha sua expressão significativamente aumentada.

Nas neoplasias pancreáticas, Tan *et al* (119) 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 (119). Em hepatocarcinomas, Yao *et al* (120) observaram dados prognósticos significativos com relação a 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 hepáticos. 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 (121-123). Esta matriz serve como base para migração de células endoteliais e para a angiogênese justa-tumoral. Por fim, a degradação da matriz de fibrina libera novos agentes estimulantes da proliferação vascular, o que contribui para a manutenção e para o incremento do estímulo angiogênico (121-123).

A terapia antiangiogênica está surgindo como um dos avanços mais significativos na área da oncologia clínica, entretanto a maioria dos estudos clínicos tem se centrado nas neoplasias de adultos (124). Tal terapia, também, pode representar uma importante estratégia terapêutica em oncologia pediátrica. Diferentemente dos tumores sólidos dos adultos, que tem origem principalmente do tecido epitelial e tem variáveis taxa de proliferação e vascularização, os tumores sólidos pediátricos exibem um forte perfil angiogênico, porque são predominantemente tumores indiferenciados, caracterizados por alta taxa de proliferação e aumento da vascularização. Dados pré-clínicos e na fase I de ensaios clínicos apoiam o potencial papel dos agentes antiangiogênicos no tratamento tumores sólidos pediátricos (125, 126). Assim, a compreensão dos processos angiogênicos, envolvidos na tumorigênese pediátrica, pode auxiliar na utilização dessas drogas em protocolos (127).

Enquanto os elementos dos nichos vasculares e de células iniciadoras de tumor pré / pró-metastática (CIT; *tumour initiating cells*, TICs) estão sendo bem caracterizados, há, também, necessidade de uma maior compreensão da atuação do sistema de coagulação no processo de formação tumoral. Entre os fatores de coagulação, o fator tecidual (TF) e a sua expressão na ativação da cascata de coagulação vem se firmando com uma importante função no processo de metástase, e, assim, implicitamente, no destino das TIC e no seu microambiente.

Um conjunto de observações sobre as TIC / CSCs poderia explicar essa relação entre os mecanismos de coagulação e tumorigênese, muitas das quais convergem para o FT como um dos fatores chave dessa via (73).

A relação dos tumores malignos com o seu suprimento sanguíneo regional vem se revestindo de importância cada vez mais significativa. 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. Frente a esses achados na literatura, o estudo de outros fatores associados à angiogênese tumoral, além da simples contagem dos vasos, parece fundamental para que seja possível compreender melhor a biologia das lesões e uma ampliação das possibilidades terapêutica oncológicas.

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

O fator tecidual (FT) é uma glicoproteína de transmembrana de 47 kDa, membro da super-família de receptores de fatores de crescimento hematopoiético (receptores de citocinas), que também incluem os receptores do interferon alfa ($\text{IFN}\alpha$) e da interleucina-10 (IL-10) e que funciona como receptor celular exclusivo da associação com o fator VII (FVII), iniciador da coagulação, formando o complexo FT:FVIIa, que tem ação proteolítica e de mediador de sinalização celular. O FT não é normalmente expresso nas células em contato direto com o sangue (tais como células endoteliais e leucócitos), mas apresenta expressão constitutiva em fibroblastos subjacentes ao endotélio vascular (73, 128-130). O complexo FT:FVIIa (Fator VII ativado) atua fisiologicamente na sinalização celular e na pró-coagulação. Além dessas, tem funções em outros processos biológicos, incluindo a hemostasia, trombose, inflamação, angiogênese e crescimento tumoral (131, 132). Porém, sua função essencial é na hemostasia. No entanto, o aumento da expressão de FT no interior das placas ateroscleróticas e a presença elevada

na circulação de seus níveis de micropartículas de FT solúvel pode promover quadros de trombose. Os níveis aumentados de FT, durante um processo inflamatório, aumenta a deposição de fibrina intravascular, assim aumentando a formação de fragmentos pró-inflamatórias de fibrina e por proteases da coagulação gerando, inclusive FVIIa, FXa e trombina, liberando protease ativada e os receptores acoplados de proteína G, principalmente, os receptores de protease-ativados (PARS). Em processos de endotoxemia e sepse, a geração de trombina dependente do FT e a ativação de células dendríticas pelo PAR1, aumentam a inflamação. Finalmente, o complexo TF:FVIIa contribui para o crescimento do tumor através da ativação *PAR2* (73, 129, 132-136).

O modelo clássico da cascata da coagulação apresenta uma série de reações sequenciais envolvendo plaquetas, os fatores de coagulação, os cofatores e os anticoagulantes naturais (Figura 2).

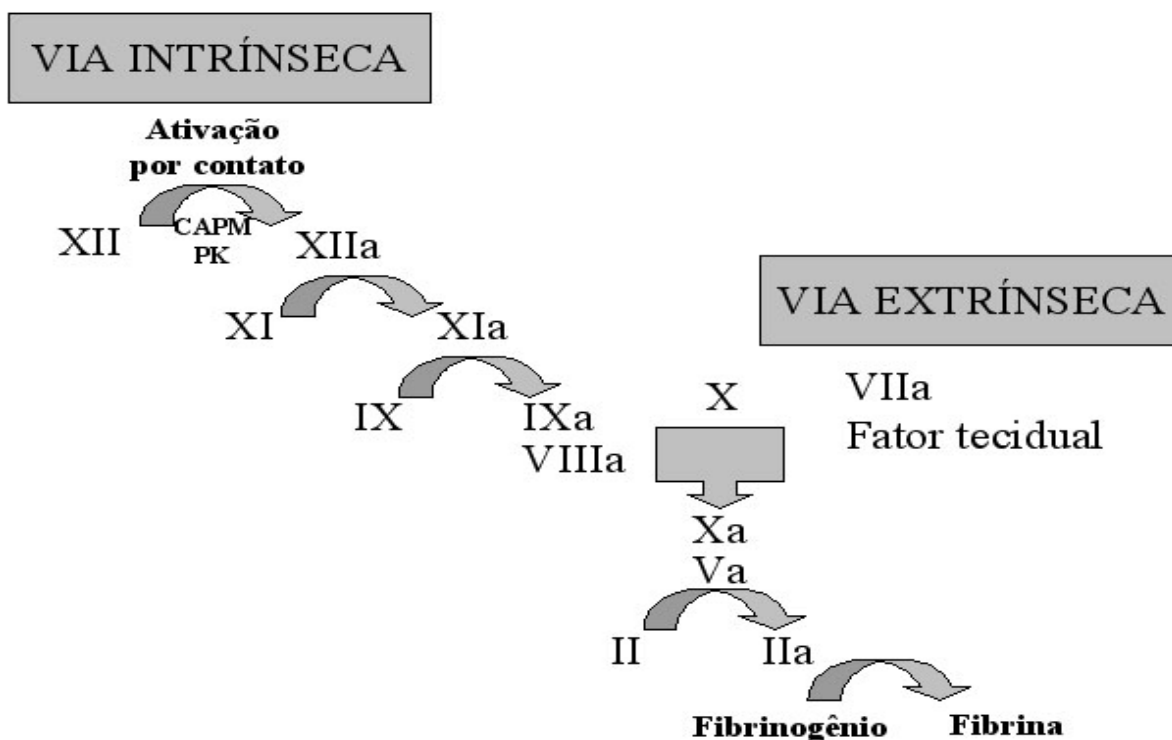


FIGURA 2. Esquema da cascata da coagulação, proposto na década de 1960, com a divisão do sistema de coagulação em duas vias. CAPM: cininogênio de alto peso molecular; PK: pré-caliceína. (129).

De acordo com este modelo, pode ser produzida uma grande quantidade de trombina, por meio da ativação da via extrínseca (dependente de FT) e/ou intrínseca (dependente do contato com uma superfície carregada negativamente). Entretanto, tal modelo explica apenas as interações que ocorrem entre fatores da coagulação *in vitro*, suportando avaliações laboratoriais. Porém, não explica satisfatoriamente os mecanismos hemostáticos fisiopatológicos *in vivo*. Além do mais, o modelo não explica por que certos pacientes apresentam uma tendência hemorrágica, bem como não fornece informação segura sobre quais pacientes vão sangrar (134). Em uma tentativa de explorar o complexo sistema hemostático sob outro ângulo, foram desenvolvidos modelos conceituais e experimentais que permitiram um maior entendimento de como o sistema hemostático realmente funciona *in vivo* em condições normais. O modelo atual baseado em superfícies celulares (Figura 3) estabelece que o processo de coagulação ocorra em uma série de três etapas simultâneas que acontecem sobre diferentes superfícies celulares. A primeira etapa (fase de iniciação) ocorre sobre uma superfície celular que expõe fator tecidual. Na segunda etapa (fase de 37 amplificações), plaquetas e cofatores são ativados para produzir trombina em larga escala. Finalmente, a terceira etapa (fase de propagação) ocorre sobre a superfície de plaquetas e resulta na produção de grande quantidade de trombina, resultando também em grande quantidade de fibrina (134).

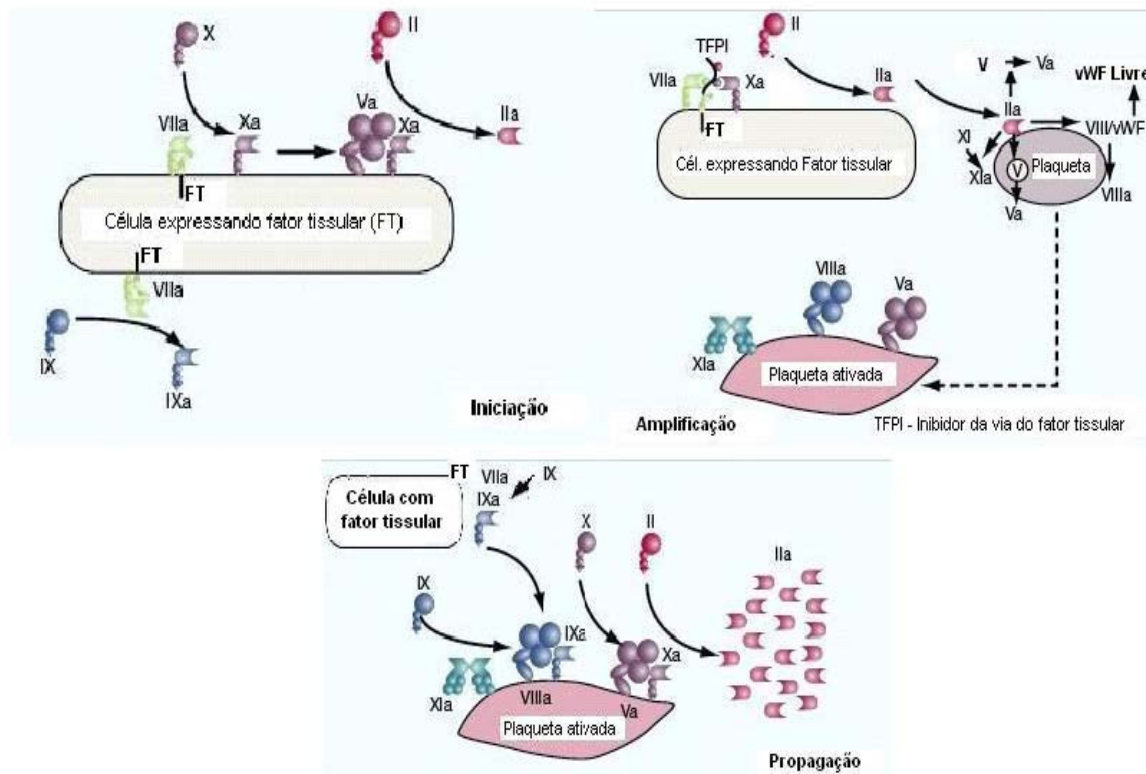


FIGURA 3 - Modelo atual da cascata da coagulação baseado em superfícies celulares *in vivo* adaptado de HOFFMAN (2003): (a) fases de iniciação, (b) amplificação e (c) propagação (134).

A Figura 3 mostra o modelo atual da hemostasia *in vivo*, no qual fator VII é ativado após se ligar ao fator tissular exposto em uma superfície celular (células endoteliais e monócitos principalmente), cujo complexo (FT-FVIIa) é capaz de ativar o fator X (Xa), o qual em presença de fator Va, é capaz de transformar protrombina em quantidades pequenas de trombina. O complexo FT-FVIIa ativa também o fator IX (IXa) (fase de iniciação). Por outro lado, na fase de amplificação, a trombina formada vai exercer suas várias funções que incluem ativação plaquetária, clivagem do complexo FvW-FVIII resultando na liberação de fator von Willebrand e de fator VIII livres, ativação dos cofatores V em Va e VIII em VIIIa, além da ativação do fator XI em XIa. Na fase de propagação, IXa combina com seu cofator FVIIIa sobre a superfície de plaquetas ativadas. Uma vez formado, o complexo FIXa/FVIIIa ativa o FX em FXa, que imediatamente combina com seu cofator Va. O complexo FXa/FVa então converte grandes quantidades de

protrombina em trombina, resultando na clivagem de fibrinogênio para monômeros de fibrina, que se polimerizam em presença do FXIIIa (ativado por trombina), resultando em um coágulo estável de fibrina (134).

Usualmente, o FT está presente nos fibroblastos da adventícia de vasos sanguíneos; cápsulas de órgãos; queratinócitos; células epiteliais de pele, mucosas, do trato respiratório e trato gastrointestinal; células musculares cardíacas, glomérulos renais, células do estroma endometrial e astrócitos (130). 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 (130). Células endoteliais e monócitos, que, normalmente, não expressam o fator tecidual, podem expressá-lo na vigência de lesão endotelial e na presença de estímulos específicos, tais como endotoxinas e citocinas (TNF- α e interleucina-1). Em indivíduos normais, níveis mínimos da forma ativada do fator VII da coagulação (FVIIa) estão presentes em circulação, correspondendo a aproximadamente 1% da concentração plasmática total de fator VII (137).

Acredita-se, também, que o FT apresente efeitos morfogênicos, por exemplo, sobre células de músculo liso. Na placa aterosclerótica, estudos demonstraram que ele é expresso em macrófagos e na muscular do vaso (130).

Além dessas funções reconhecidas, o FT pode apresentar outras não relacionadas à coagulação sanguínea. Sua expressão se encontra aumentada em vários tipos celulares tumorais, apresentando atividade pró-coagulante (121, 130). 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 (121, 130).

A expressão do FT pode provocar quadros de trombose arterial, trombose venosa e coagulação intravascular disseminada (CID; DIC). Em contraste aos altos níveis de FT nas paredes dos vasos, apenas níveis muito baixos dele estão presentes circulando no sangue de indivíduos saudáveis. Esta apresentação circulante do FT é composta de micropartículas solúveis (MPs), que são micro-fragmentos derivados da membrana celular, que são utilizados na ativação e/ou

apoptose celular. Monócitos não ativados expressam baixos níveis de FT e podem ser a fonte primária desses MPs. Várias patologias, como as doenças cardiovasculares, sepse e câncer, apresentam níveis aumentados de MPs solúveis de FT. Porém, a mais importante atuação das MPs solúveis é na formação da trombose (132).

Conforme revisado por Buller (138), o FT induz a expressão do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e diminui a produção de trombospondina, resultando em maior angiogênese, adesão e migração das células tumorais, além da redução da capacidade apoptótica destas células.

Além disto, tanto o FT quanto o VEGF tem expressão aumentada na hipóxia, fenômeno frequentemente observado no câncer (139). Aparentemente, duas vias fisiopatológicas existem para explicar o estímulo angiogênico do FT (121), sendo apenas uma delas dependente do mecanismo de coagulação (121, 122).

O aumento dos níveis do FT no câncer é atribuído às influências reguladoras das vias de sinalização oncogênicas (140, 141), que pode ser associada ao processo de modificações induzidas no microambiente tumoral (142-144). Ativação do K-ras e dos membros da família ErbB, como os receptores do fator de crescimento (*Epidermal growth factor receptor* - EGFR) e EGFRvIII, que regulam o aumento da expressão do FT na superfície de células oncológicas (144-146) e desencadeiam a liberação das microvesículas contendo o FT, na circulação de animais portadores de tumor (141, 144). Esses eventos contribuem para formação tumoral e angiogênese através das mudanças nas expressões de fatores angiogênicos (141), ou induzindo a iniciação da formação tumoral (144). Pacientes que apresentam tumores malignos humanos induzidos por ErbB (oncogene do vírus da eritroblastose aviária), são mais propensos a coagulopadias e uma superexpressão do FT (como observado em tumores malignos de mama, pulmão, cérebro ou tumores de ovário) (147), mas a importância dessa associação e sua natureza molecular ainda não foram compreendidas. Yu e colaboradores (131) demonstraram que a inibição farmacológica de dois oncogenes ErbB, o HER-2 (receptor do fator de crescimento

epidérmico humano 2) e o EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), podem regular diminuindo a expressão de FT em linhas de células oncológicas humanas. O gene EGFR induz o aumento da expressão do FT. A superexpressão do FT, regulada pelo EGFR, é inibida em células malignas onde a proteína quinase supressora de ras-1 (KSR1) tem sua expressão diminuída ou inibida. Inversamente, as células malignas que superexpressão o KSR1 apresentam um aumento na tumorigênese dependente do EGFR e de níveis elevados de FT (105).

Toshi e colaboradores (148) 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 à 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 (149).

O crescimento tumoral maligno pode provocar ativação exacerbada, prolongada e não programada da via do FT, através de vários diferentes mecanismos (75, 150). Estes incluem: acumulação de células inflamatórias e estromais, com propriedades pró-coagulantes, dentro da massa tumoral maligna; expressão anormal do FT, por indução de angiogênicos ou ativação de células endoteliais dos vasos tumorais, anomalias estruturais, estase e hiperpermeabilidade da microcirculação relacionada ao tumor e extravasamento plasmático de fatores de coagulação no espaço perivascular, contendo células que expressam o FT; entrada, disseminação e metástase, através do lumen vascular, das células malignas que expressam o FT (151), emissão de FT solúvel em microvesículas pró-coagulantes (micropartículas), no espaço perivascular e da corrente sanguínea (141, 152, 153). Estes e outros processos relacionados com

FT podem provocar manifestações sistêmicas de coagulopatia oncológica e / ou trombozes, no sistema vascular do tumor (73, 150).

Também foi identificada a expressão do fator tecidual em diversas células de tecidos embrionários como epitélio, 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 (130). Mais recentemente, estudos com inativação de genes revelaram que a deficiência do FT é letal para embriões em função de um desenvolvimento vascular comprometido (130, 154). Esse desempenho do FT, em vários processos biológicos, acarreta um grande desafio para seu estudo, pois, em camundongos *knock-out* para o gene *FT*, é uma condição letal e a inibição do *FT* pode induzir a hemorragia. Entretanto, esses problemas foram superados com o desenvolvimento de ferramentas farmacológicas e abordagens genéticas. Por exemplo, através do uso de um anticorpo monoclonal, denominado 10H10, foi identificado que sua utilização inibe a via de sinalização celular dependente de FT, mas sem afetar as atividades hemostáticas do FT. Este anticorpo pode ser utilizado em estudos de sinalização do FT, sem afetar as vias fisiológicas da hemostasia (132). Além do período embrionário, outras circunstâncias podem induzir a expressão do FT. Citocinas inflamatórias como o TNF (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 (130).

Observa-se que o TF, expresso pelas células tumorais, desempenha importante papel no processo de metástase, através da ativação da cascata de coagulação. Estudos preliminares indicaram que o FT também atua no aumento do crescimento tumoral e de sua angiogênese. Entretanto, ainda não está claro o papel do FT nesse crescimento do tumoral. Em pesquisa utilizando ratos avaliou-se a expressão do FT através de siRNA (short interfering RNA), em carcinoma colorretal, onde se observou uma redução drástica no crescimento do tumor sem consequências para o crescimento tumoral *in vitro* (141). Outros estudos tem

mostrado que a inibição farmacológica do complexo FT:FVIIa reduz o crescimento do tumor em ratos (155). A mais provável explicação para esses resultados é que o FT, na superfície das células tumorais, liga-se ao FVIIa e que este cliva o PAR2. Apoiando esta hipótese, a inibição seletiva da sinalização do complexo TF:FVIIa, usando o anticorpo 10H10, reduz o crescimento do tumor de mama, em camundongos (156). O mecanismo preciso pelo qual o complexo TF:FVIIa-PAR2 atua na via do crescimento tumoral não está esclarecida, mas as possibilidades incluem a promoção da sobrevivência tumoral e/ou aumento de sua angiogênese. A geração de trombina dependente do FT e ativação de *PAR1* sobre as células tumorais podem também aumentar o crescimento de alguns tumores (132).

A complexa regulação do FT é, muitas vezes, dependente da sinalização exclusiva para cada tipo particular de célula (75, 157). Por exemplo, no endotélio normal, FT pode ser desencadeado pelas vias participação da proteína quinase C (PKC), MAPK e de fatores de transcrição (EGR-1, NFκB, AP1 e NFAT) (158, 159). Nas células cancerosas, os efeitos do EGFR oncogênico em TF são mediados através de um mecanismo NFκB dependente (144), bem como por processos envolvendo AP-1 e c-Jun N-terminal quinase (JNK) (146). Desde então, do promotor FT também contém sítios funcionais para outros fatores de transcrição, incluindo o SP1 e EGR-1 e diversos caminhos alternativos também podem estar envolvidos no controle do *FT* e do *EGFR* em várias vias (157). As evidências experimentais disponíveis sugerem que o FT pode ser regulado pela via PI3K/Akt, após a perda do gene supressor de tumor PTEN, em células de glioma (142). Outras vias oncogênicas podem controlar a expressão do *FT*, como nas encontradas induzidas por mutações do *K-ras* e *p53* (gene supressor de tumor) (141). É interessante notar que enquanto ratos KSR1 *-/-* (ao contrário de ratos TF *-/-*) são viáveis, eles também são resistentes à tumorigênese epiteliais induzida por H-ras e exibem anomalias cutâneas induzidas pela deficiência EGFR (160). No estudo de Yu e colaboradores (131), adicionou-se o KSR1 à lista de mediadores envolvidos na regulação oncogene-dependente de FT que poderiam afetar a angiogênese, a coagulopatia e a progressão tumoral. Assim, observaram que seria possível prever os efeitos desses agentes através da avaliação dos níveis de

FT nos tecidos tumorais. Esses estudos apresentam a possibilidade de acompanhar a progressão tumoral e a resposta terapêutica através dos níveis de FT.

A relação entre os mecanismos de coagulação e o desenvolvimento do câncer é reconhecida desde longa data. Em 1865, Armand Trousseau (121) observou que pacientes que se apresentavam com trombo-embolismo sintomático, frequentemente eram também portadores de uma neoplasia maligna oculta. Ele também notou que indivíduos reconhecidamente portadores de um tumor maligno apresentavam uma maior tendência para fenômenos de natureza trombo-embólicos. Levantamentos estatísticos 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 (161). 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 ao observado na população em geral, de terem diagnosticada uma neoplasia maligna nos seis meses a um ano subsequentes (162). Esta chance é ainda maior se um segundo episódio de trombose ocorrer (162). Nesse contexto o FT parece ser um dos agentes associados aos estados de hipercoagulabilidade relacionados aos tumores malignos (121, 163). Sua expressão se encontra aumentada em câncer de pulmão de pequenas células, de pulmão (164), os gliomas (165) e os carcinomas de mama (166), pâncreas (167), cólon (168) e próstata (169), sendo também relacionada com estágios avançados destas doenças. A detecção imunohistoquímica positiva do FT foi observada em 88,3% das amostras (41 pacientes) analisadas de TW. Nessa pesquisa o FT foi associado à recorrência tumoral e sobrevivência ($p=0.01$ e 0.02 , respectivamente), sendo, também, associada como importante fator de risco à metástase e mortalidade nessa população (1).

Azevedo e col. (170) analisando a expressão diferencial do FT em peças de biópsias de adenocarcinoma colorretal, verificaram que essa expressão foi significativamente mais alta do que no grupo controle, apresentando ainda uma

associação positiva dessa expressão do FT com a idade mais elevada dos pacientes e com a presença de metástases.

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 (121). A fosforilação da porção citoplasmática do FT induz a formação de uma seqüência de sinais intracelulares que resultam na transcrição de vários genes (121, 123, 145, 171). O fator de crescimento vascular endotelial tem sua transcrição aumentada pela ativação do FT, levando a um potente estímulo angiogênico (121, 123, 145, 171). Por outro lado, a trombospondina é inibida pelo FT, reduzindo a sua capacidade anti-angiogênica (121). Além disso, o aumento da atividade do VEGF, por ação do FT, resulta em permeabilidade vascular aumentada as proteínas plasmáticas, com deposição de fibrina na forma de uma matriz junto às células tumorais. Tal matriz representa também um estímulo à 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) (121). 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 (121).

Ainda não se conhece a real parcela de responsabilidade de cada um destes mecanismos na fisiopatologia do FT em relação ao desenvolvimento do câncer. Coletivamente, essas observações sugerem que os eventos oncogênicos desregulam o mecanismo sensorial pelo qual as células são programadas para responder a contato com sangue e atividades regulatórias (FVIIa, FXa, trombina e outros). Como as lesões oncogênicas, especialmente as que levam ao surgimento das CSCs / TICs, podem induzir mudanças no sistema de coagulação, este proporcionaria um microambiente tumoral favorável a seu desenvolvimento e disseminação (73).

Hembrough *et al* (155), 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). Esses autores demonstraram que dois inibidores do complexo FT/FVIIa diminuíram a progressão de lesões primárias e metastáticas de melanoma em camundongos. 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 sanguínea.

Rickles *et al* (172) 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 sequência codificante completa do FT, estas células se tornaram produtoras destes dois elementos. Por outro lado, quando se inoculou uma sequência de FT com alterações na porção intracitoplasmática que impediam a fosforilação, o que se observou foi uma intensa produção do FT, mas não do VEGF. Estes resultados sugerem que a porção citoplasmática do FT é necessária para o estímulo à produção do VEGF. Tais achados se somam aos de Abe e colaboradores (173) que observaram, 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 inoculados em camundongos imunossuprimidos produziram lesões sólidas altamente vascularizadas. Por outro lado, melanomas com baixa expressão destes dois elementos produziram tumores relativamente avasculares. A inoculação de uma sequência de DNA para o FT que produzisse uma proteína cuja porção citoplasmática fosse inutilizada levou à expressão do FT, mas a uma baixa taxa de VEGF. Se a cadeia de DNA inoculada, por outro lado, levou somente à inativação da porção extracelular do FT, ou seja, a porção

ligante do Fator VII ativado, os níveis de VEGF foram semelhantes àqueles vistos em tumores produtores de FT.

Zhang *et al* (171) 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, afetou a região intracelular, mesmo que a expressão do FT estivesse plenamente demonstrada, a produção do VEGF ficou significativamente comprometida. Se, por um lado, a porção citoplasmática do FT 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 (174) 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 sanguínea.

Amirkhosravi *et al* (139) avaliaram a importância da hipóxia, um achado frequente 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 rato *nude*, 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 e não de sua porção intracitoplasmática. 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 *et al* (175) avaliaram a expressão do FT em 67 pacientes com adenocarcinoma colorretal, 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 *et al* (176) avaliaram a expressão de FT em 100 tumores malignos colorretais. O fator tecidual estava presente em 57% da amostra. Além disto, observou-se uma relação significativa entre a expressão do FT e a do VEGF.

Kleinman *et al* demonstraram que as células tumorais humanas de neuroblastoma induziam angiogênese em camundongos *nude* durante a tumorigênese (177, 178). Canete e colaboradores usaram o anticorpo anti-CD34 para avaliar a angiogênese tumoral, em um estudo retrospectivo de 69 pacientes com neuroblastoma. A vascularização não foi correlacionada a outros fatores prognósticos, tais como idade, estadiamento, histopatologia, TRK-A, expressão da glicoproteína-P ou número de cópias de N-myc, metástase ou sobrevivência. Concluíram que a vascularização do tumor não é fator preditivo de sobrevivência, nem de metástase (178).

Langer *et al* estudaram a expressão do RNAm (RNA mensageiro) de dois receptores do VEGF, os VEGFR-1 (Receptor do fator de crescimento vascular endotelial- *vascular endothelial growth factor receptor*) e VEGFR-2, em espécimes cirúrgicas de neuroblastoma e em linhagens celulares, por reação de polimerase em cadeia (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR). Todas as linhagens celulares expressaram o RNAm do VEGF, enquanto, apenas a linhagem celular SK-N-BE expressou o RNAm codificante para a VEGFRs. As biópsias expressaram tanto RNAm de VEGF, como para VEGFRs (179).

Motawa *et al* (180) observaram uma elevação significativa de VEGF, em soros de diferentes tipos de tumores malignos pediátricos, em comparação com crianças saudáveis. Egyert, Jkegaki e Kiatkowska (181) demonstraram que o nível de expressão de VEGF foi associado ao estágio avançado do tumor humano de neuroblastoma. Isto indica que o VEGF poderia desempenhar um papel

fundamental nesse crescimento tumoral e suas metástases. Tal importante papel do VEGF, nesse tipo de tumores sólidos pediátricos, poderia ser aplicado a outros tipos de pacientes oncológicos pediátricos (180).

Hamada *et al* (182) avaliaram a expressão do FT em 44 espécimes cirúrgicos de gliomas. Seus dados concluíram que o nível de expressão estava relacionado ao 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. O nível de expressão do FT, em gliomas, correlaciona-se com o grau histológico do tumor (74).

Nitori *et al* (183) avaliaram a frequência da expressão do FT, 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 associou com a agressividade deste tipo de tumor.

Poon *et al* (184) estudando casos de carcinoma hepatocelular, avaliaram a relação entre a expressão do FT, a DMV e fatores prognósticos. A atividade do FT foi associada a uma maior densidade de vasos sanguíneos, bem como, a uma elevada presença de VEGF. Além disso, tumores positivos para FT demonstraram maior ocorrência de invasão venosa, estágios clínicos mais avançados e lesões não encapsuladas. De fato, o FT se mostrou como fator prognóstico negativo independente nestas lesões.

Em pesquisa com carcinoma hepatocelular foi observado importante relação prognóstica do FT com tal tumor. Indivíduos com tumores que expressavam o FT apresentaram uma maior frequência de trombose neoplásica da veia porta, metástases intra-hepáticas 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 (185).

Em casos de adenocarcinoma de próstata, Abdulkhadir *et al* (169) 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 *et al* (186) 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.

Koomagi *et al* (187) estudaram a expressão do FT em 191 neoplasias malignas pulmonares do tipo não pequenas células. Nestes casos, a atividade do FT foi associada à intensidade da expressão de VEGF e com a DMV 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.

Fillmann (188) observou, através de análise de imunoistoquímica, que o FT se expressa intensamente na membrana celular e no citoplasma de células de adenocarcinoma do cólon e reto, bem como, a existência de uma relação positiva entre o grau da expressão do FT e a angiogênese tumoral, com DMV significativamente mais alta em lesões nas quais a expressão do FT é elevada.

Em um estudo com carcinoma epidermóide de boca, utilizando análise por imunoistoquímica, não foi observado uma associação entre o FT e DMV à ocorrência de metástase cervicais dessa patologia, nem à sobrevida desses pacientes analisados (189).

A expressão do FT pode ser correlacionada com a diminuição da diferenciação do tumor (190). Entretanto, dados referentes à importância do FT em células tumorais devem ser interpretados com cautela, uma vez que a

expressão funcional e antigênica é fortemente dependente da origem de tecido maligno e pode mudar quando as células são manipuladas *in vitro* (191).

Em face de esses achados o estudo das interações entre o FT e o câncer, especialmente no que se refere aos 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 e microambiente tumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a expressão diferencial do FT em tumor de Wilms, através da técnica de quantificação de ácidos nucleicos (RNAm) por Reação Cadeia de DNA Polimerase em Tempo Real (RT-PCR).

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a expressão do FT em diferentes componentes histológicos de tumores de Wilms;
- 2- Relacionar a expressão do fator tecidual com a densidade microvascular dos tumores de Wilms;
- 3- Relacionar a expressão do FT com a ocorrência de metástases.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo

Este estudo se caracteriza como uma pesquisa clínica do tipo transversal. Os dados referentes à densidade microvascular (DMV) bem como as secções histológicas contendo TW empregados no presente estudo já tinham sido alvo de investigação por parte de Maciel et al.(70).

4.2 Local do estudo

Os ensaios experimentais foram desenvolvidos no Laboratório de Anatomia Patológica do HSL-PUCRS (preparo do material e isolamento do RNAm) e no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CP-BMF) (análises de expressão).

4.3 Sujeitos de pesquisa e métodos

4.3.1 Seleção da amostra e material utilizado

Foram analisados dados anátomo-patológicos, e acompanhamento clínico, de 41 pacientes pediátricos com tumor renal de Wilms em peças de biópsias realizadas nos pacientes submetidos a nefrectomias totais ou parciais realizadas no Hospital São Lucas da PUCRS com diagnóstico de tumor de Wilms desde julho de 1993 a julho de 2003, mas só 27 pacientes preencheram o critério de inclusão. Todos os pacientes foram operados e acompanhados independentemente de

receberem tratamentos complementares, com seguimento até o óbito ou até o momento da análise dos dados (junho de 2007).

4.3.2 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 944/10 e 10/05168-CEP) (Anexo A).

Como as análises por Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (*Real Time Polymerase Chain – Reation*) RT-PCR, não tiveram influência no tratamento e evolução dos pacientes vivos, foi dispensado o termo de Consentimento e preenchido o Termo de Compromisso para utilização de Dados em Projetos de Pesquisa (Anexo B).

4.3.3 Critérios de inclusão

Blocos de parafina de biópsias para análises das variáveis principais do estudo:

- Expressão do fator tecidual
- Densidade microvascular

Análise dos espécimes ressecados:

- Anátomo patológicos foram aqueles originalmente obtidos na análise dos espécimes ressecados.

- Todo o material histológico, em arquivo, foi revisado e obtiveram concordância diagnóstica entre dois patologistas.
- Foi observado: idade, gênero, grau de diferenciação histológica das neoplasias, profundidade de penetração tecidual loco regional e metástases.

4.3.4 Critérios de exclusão

Foram excluídas as amostras com tecido parafinizado inviáveis à extração do RNA.

4.4 Quantificação da densidade microvascular

A contagem de microvasos foi originalmente como descrito por Maciel *et al* (70), realizada se utilizando marcação imunoistoquímica com anticorpo anti-CD34 endotelial (*CD34 classe II Clone QBEnd 10, Dakocytomation, EUA*) em secções de tecido neoplásico obtidas consecutivamente. Para a realização da contagem do número de vasos sanguíneos por área de tumor se utilizou 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. Esse 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 de 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. O procedimento de análise de imagem foi realizado por contagem sem viés (*unbiased*) pela inserção de uma grade de correção com amplitude de 1312X960 pixels, correspondendo à área de 0,66 mm². Foram contados os vasos dentro da área da grade, ou que tocaram a linha de demarcação pontilhada. A contagem foi realizada numa escala ordinal, sendo obtida a média aritmética dos 20 campos selecionados em cada “*hot spot*”.

4.5 Técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real

4.5.1 Microdissecções e extração do RNA total

Foram realizadas microdissecções do tecido neoplásico e de morfologia normal de cada amostra a partir de lâminas histológicas. Previamente ao isolamento do RNA, secções de tumores incluídos em parafina foram coradas com hematoxilina/eosina e analisadas em microscópio ótico por dois patologistas experientes a fim de definir os limites da lesão. Cada peça incluída forneceu duas

amostras, uma proveniente do tecido não neoplásico (controle) e outra da lesão em seus diferentes componentes quando possível. Dez secções de 10 µm seguintes àquela corada com hematoxilina e eosina utilizada como referência foram obtidas e nas mesmas o tecido não comprometido (margem de segurança) da lesão neoplásica foram manualmente separadas. O RNA total foi isolado a partir dos tecidos parafinizados com o auxílio de um kit comercial (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) especificamente desenvolvido para isolamento de ácidos nucleicos a partir de secções de parafina fixadas com formalina. Para tanto, as 10 secções de tecido não comprometido e tecido neoplásico excisados foram separadamente incubados em tampão para remoção da parafina e mantidos em banho-maria a 70°C por 30 a 60 minutos. Após a centrifugação a fase líquida contendo ácidos nucleicos e proteínas foram coletadas e transferidas para a mini coluna cromatográfica de afinidade a fim de eliminar remanescentes da parafina e permitir o aprisionamento do RNA. Após sucessivas etapas de lavagem da coluna o RNA purificado foi diluído em água livre de RNases (30 µl) a 60°C e armazenado a -80°C. Para evitar uma possível contaminação com DNA genômico durante a extração de RNA total, prévia à transcrição reversa, as amostras serão tratadas com a enzima Deoxiribonuclease I (DNase I 124 U/µl, Invitrogen, USA). Esta enzima cliva DNA de fita simples e dupla que contém extremidades 5' fosfato. A concentração de RNA foi determinada através de plataforma fluorimétrica (QuBit[®], Invitrogen, California, USA) a partir da diluição seriada de padrões de referência. A qualidade do RNA total foi verificada através de gel de agarose desnaturante contendo formaldeído a 37% corado com SYBRGold[®] (Invitrogen[™], Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). Somente amostras contendo bandas definidas correspondentes ao RNA ribossomal 18s e 28s foram consideradas para análise. A pureza das amostras (relação ácido nucleico/proteína) foi determinada através de espectrofotometria, medindo a razão entre a absorbância a 260 nm 280 nm; somente amostras cujo valor apresentou-se ≥ 1.7 foram admitidas no estudo.

4.5.2 Transcrição Reversa e pré-amplificação do cDNA

Uma visão geral dos procedimentos empregados nessa etapa é sumarizada na figura 4. O cDNA foi sintetizado a partir de 80 ng de RNA total isolado utilizando primers oligoméricos (random primers), dNTPs, $MgCl_2$ e a enzima derivada do vírus da leucemia mielóide aviária (MultiScribe™ Reverse Transcriptase, TaqMan® Reverse Transcription Reagents, Roche Molecular) em 20 μ l de reação. A mistura contendo os reagentes para transcrição reversa foi submetida a três diferentes temperaturas de aquecimento em tempos determinados no termociclador (Techne™ TC-412, Duxford, Cambridge, UK): 25°C por 10 min, 48°C por 30 min e 95°C por 5 min para finalizar a reação de RT-PCR. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C. Uma reação de pré-amplificação do cDNA foi incorporada ao processo devido as usuais reduzidas concentrações de RNA obtidas a partir de secções de tecidos fixados e preservados em parafina. Nessa abordagem os cDNA total é enriquecido para os genes de interesse a partir de um pré tratamento com os primers para amplificação.

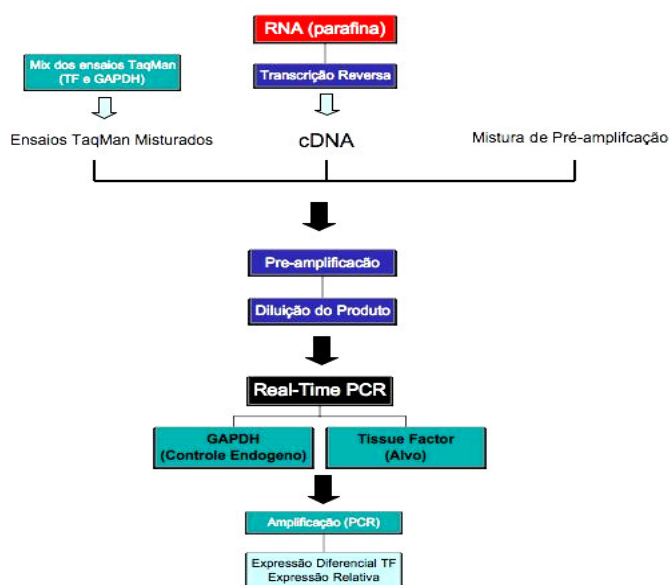


FIGURA 4. Sumários dos procedimentos empregados na etapa de pré-amplificação da amostras e quantificação final.

Assim, foram preparadas reações de pré-amplificação para cada amostra contendo dNTPs, $MgCl_2$, tampão (TaqMan pré-amp reaction Mix[®], Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e mistura dos ensaios de amplificação contendo primers e sonda para o FT humano (Gene Expression Assays, Assays-on-Demand, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e GAPDH (controle endógeno) diluídos 100X em tampão. Aproximadamente 10 ng do cDNA foi por fim adicionado à reação de pré-amplificação e posteriormente submetido a 14 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 4 min. Os produtos da pré-âmplificação foram aliquotados e armazenados em freezer (-20°C) até seu emprego na quantificação através de PCR em tempo real.

4.5.3 PCR quantitativo baseado em fluorescência

A tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) associada à fluorescência foi utilizada para estimar variações na expressão diferencial do gene de interesse (192, 193). Para tanto, a mistura contendo cDNA foi incubada com primers e sonda TaqMan[®] (Assays on Demand, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para o gene Fator Tecidual humano (*TF*, gene-alvo) e Gliceraldeído fosfato desidrogenase humana (*GAPDH*, controle endógeno). A inclusão de um controle endógeno permite a normalização dos resultados, corrigindo possíveis variações na eficiência da reação enzimática entre diferentes amostras (194-196). As amostras foram preparadas em duplicatas e para cada amostra, tumorais ou não, e a amplificação do controle endógeno e do gene alvo foram conduzidas. O tipo de quantificação escolhida para avaliar a expressão dos genes foi a quantificação relativa que se baseia na comparação da expressão dos genes de interesse de tecidos tumorais em relação a tecidos normais (calibrador), utilizando o *GAPDH* como controle endógeno da reação (195). De cada amostra analisada foram preparadas duplicatas contendo 25ng de cDNA pré-amplificado, produto resultante da transcrição reversa e uma mistura previamente preparada (TaqMan[®]

Universal PCR Master Mix), contendo primers e sondas com o marcador de fluorescência específicos para o FT (TaqMan[®] Gene Expression Assays, Assays-on-Demand, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), incluindo também, primers e sondas para GAPDH (controle endógeno). O volume final da reação para cada duplicata foi de 25µl preparadas em placas de 96 poços. As condições de temperatura para a realização da PCR em tempo real foram divididas em quatro estágios: primeiramente as misturas foram submetidas a uma temperatura de 30°C por 2 min, o segundo estágio seguirá a 95°C por 10 min, o terceiro estágio foi estabelecido com 50 ciclos a 95°C por 15s e 60°C por 1 min. Os ensaios foram conduzidos em termociclador (ABI 7500, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) acoplado ao complexo de captura da fluorescência e conectado a um computador.

A validação e verificação da eficiência das reações foi conduzida através da diluição seriada (fator de diluição 10) de uma amostra de cDNA tumoral de concentração conhecida para o controle endógeno e o gene alvo. Se o resultado da equação de regressão para ambos os genes mostrar-se acima de 95% a eficiência é considerada igual e a partir desse resultado pode-se optar por uma técnica de quantificação relativa aritmética excluindo a necessidade de padrões (195). Nas análises conduzidas a eficiência de ambos, gene alvo e controle endógeno se mostraram adequadas (0.998 e 0.9854 respectivamente), permitindo o emprego de quantificação relativa baseada no método (197). A quantificação do ácido nucléico extraído será realizada através da leitura da densidade ótica (DO).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados categóricos foram descritos por frequência e percentual e os quantitativos por média e desvio padrão. Comparações entre os componentes histológicos foram conduzidas através do teste ANOVA com *post-hoc* de Bonferroni. Para comparações entre a expressão entre amostras metastáticas e não metastáticas se empregou o teste t de Student. Associação entre variáveis (metástase x FT e DMV e FT) foram conduzidas através de teste de Pearson. A normalidade das variáveis analisadas foi verificada através dos testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov. As análises foram realizadas com o auxílio do programa estatístico (Prism 4 for Mac, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da amostra

A amostra foi composta por 27 pacientes com tumor e 26 controles (área sem tumor), obtidos de margens de segurança das amostras. Foram obtidos os dados nos prontuários desses pacientes, para a análise dos dados demográficos e clínicos. A tabela 3 sumariza as características demográficas e das lesões dos sujeitos de pesquisa cujos blocos constituíram a amostra analisada. Da mesma forma, na maior parte dos casos não foi possível obter informações relativas ao desfecho junto aos pacientes após o período de análise do primeiro estudo, razão pela qual os mesmos não foram incluídos. Além disso, a impossibilidade de obtenção de margens de segurança e, por conseguinte, controles pareados para todas as amostras tumorais, impediu a análise das variações intra-individuais.

TABELA 3. Características clínicas e anátomo-patológica da amostra (n=27)

Mediana da Idade		2,9 (0,3 a 7,0)
Sexo	Feminino	15 (55,6%)
	Masculino	12 (44,4%)
Localização	Rim direito	11 (40,7%)
	Rim esquerdo	16 (59,3%)
Diferenciação histológica	Favorável	22 (81,5%)
	Desfavorável	5 (18,5%)
Estadiamento (SIOP-9)	I	5 (18,5%)
	II	11 (40,7%)
	III	7 (25,9%)
	IV	4 (14,8%)
	V	0
Recidivas tumorais	Sim	13 (48,1%)
	Não	14 (51,9%)

Na população estudada a média de idade foi de 2,9, sendo 55,6% dos indivíduos do sexo feminino e 44,4% do sexo masculino. Em relação a presença de metástase 48,1% dos indivíduos apresentaram metástase e 51,9% não manifestou metástase. Dos 41 blocos originalmente empregados por Maciel *et al* (1), somente 27 foram analisados no presente estudo no tocante à expressão gênica. Isso se deve à impossibilidade de obtenção de amostras com margem de segurança para todas as peças ou problemas concernentes à qualidade do RNA total isolado. Além disso, não se obteve dados demográficos para um dos pacientes, motivo pelo qual existe leve disparidade entre o “n” de diferentes análises.

6.2 Expressão do FT em Tumor de Wilms

As amostras de tecido em secções em blocos de parafina foram submetidas à dissecção com auxílio de microscópio de luz sob magnificação de 100x e *micropunch*. Os espécimes oriundos de cada um dos componentes histológicos foram removidos manualmente e submetidos a processamento para isolamento do RNA total. Assim, essa abordagem permitiu a seleção de 4 diferentes componentes: blastoma, epitelial, estromal e controle. Não foi possível obter o mesmo número de componentes para todas as amostras, motivo pelo qual a análise empregou testes estatísticos para amostras independentes. A inexistência do componente na secção, a impossibilidade de separar precisamente cada um dos componentes diretamente sobre a lâmina ou aspectos concernetes à qualidade, concentração e/ou pureza do RNA foram responsáveis pela variabilidade no número de amostras de cada componente. A quantificação empregando tecnologia da reação em cadeia da DNA polimerase associada à fluorescência foi conduzida como descrito em material e métodos. A figura 5 apresenta histogramas de amplificação representativos de amostras do grupo controle e tumorais blastoma/epiteliais. Observa-se que amostras tumorais

apresentam amplificação além do *background* (Ct), atingindo linearidade em menor número de ciclos, atestando a maior quantidade de RNAm para o FT nessas amostras.

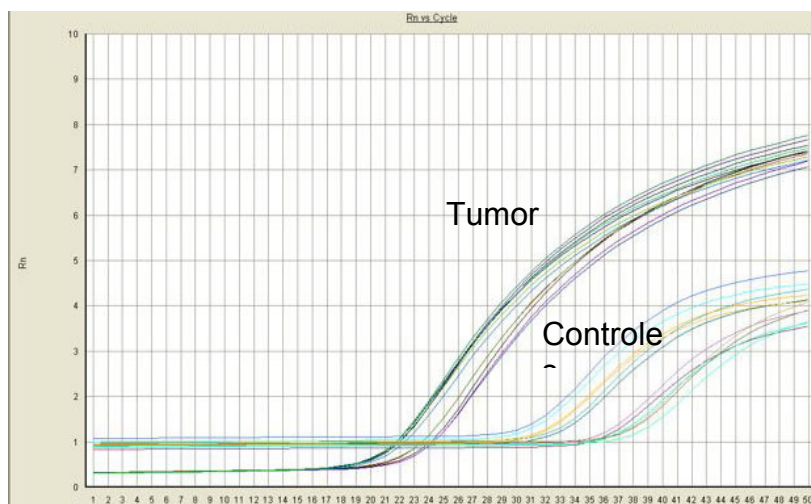


FIGURA 5. Histograma de amplificação do FT em amostras tumorais e controle. Observa-se que a fase de amplificação linear inicia-se em ciclagens mais baixas em tumores, atestando o maior número de moléculas de FT nessas amostras.

É importante observar que, apesar dos níveis razoavelmente baixos de RNA total obtidos de secções parafinadas, a introdução de etapa de pré-amplificação usando cDNA e as sondas/primers para os genes aqui considerados durante a amplificação, *i.e.*, *FT* e *GAPDH*, foi extremamente eficiente em intensificar o sinal. A figura 6 mostra as variações na expressão do *FT* distribuídas por tipo de componente e o respectivo número de amostras tabuladas em cada grupo. Assim, do total de 27 amostras, obtiveram 21 blastomas, 13 em componentes epiteliais e 5 estromais. É importante salientar que eventualmente uma amostra tumoral incluída em parafina gerou mais de um componente tumoral. Do total de 27 amostras foi ainda possível obter margens de segurança (controles não tumorais), confiavelmente isentas de sinais de displasia, em 26 blocos. A expressão relativa do FT foi calculada usando o sistema $2^{\Delta\Delta Ct}$ como descrito em

material e métodos, tendo como calibrador o componente controle não tumoral e controle endógeno o GAPDH. Os resultados revelaram que o componente blastematoso e epitelial apresentaram maior expressão do FT relativamente ao componente estromal e controle.

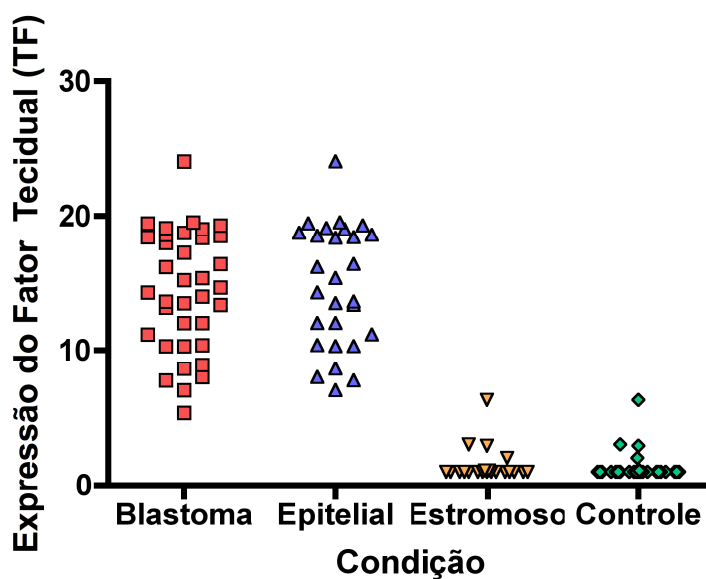
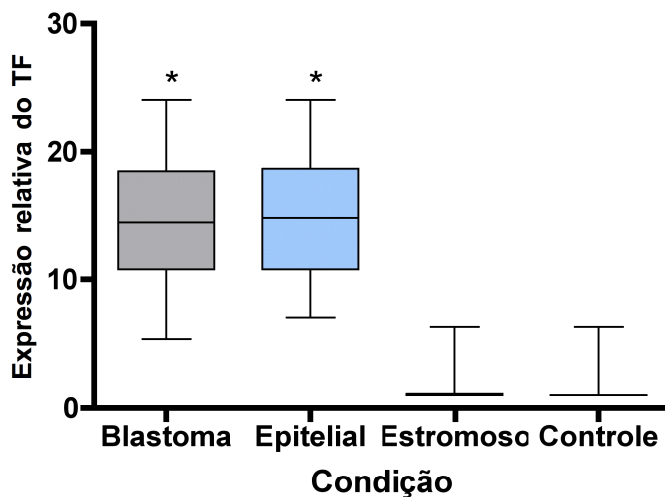


FIGURA 6. Distribuição das amostras por componente relativo a expressão do FT.

A Figura 7 apresenta as médias e desvios padrão da expressão por grupos, na qual fica evidente que em componentes do tipo blastoma e epitelial o FT é expresso 14.38 e 16.02 vezes mais que no componente controle não tumoral, respectivamente ($P < 0.001$). O componente estromal apresentou expressão muito semelhante àquela do controle, apenas 3.8 vezes mais, não atingindo significância nessa análise ($P > 0.05$).



*P<0.001

FIGURA 7. Comparações das médias de expressão do FT por componente. Componentes blastematosos e epiteliais apresentaram expressão mais elevada do FT ($P<0.001$) comparativamente a componentes estromais e controle não tumorais.

6.3 Eventos Metastáticos e Expressão do FT

A fim de estabelecer associações entre o FT e a agressividade das alterações no momento em que foram biopsiadas, conduziu-se análise da expressão em peças com diagnóstico de metástase (Figure 8). Obtiveram-se informações de estadiamento em 25 espécimes do total de 28 peças analisadas (12 metastáticos e 13 não metastáticos). Interessantemente, observou-se que a média de expressão do FT em peças diagnosticadas como metastáticas foi significativamente maior (16.3 vezes) que em espécimes não disseminados (11.2 vezes), sendo a diferença significativa ($P<0.05$). Para essa análise se empregaram componentes estromais do tumor.

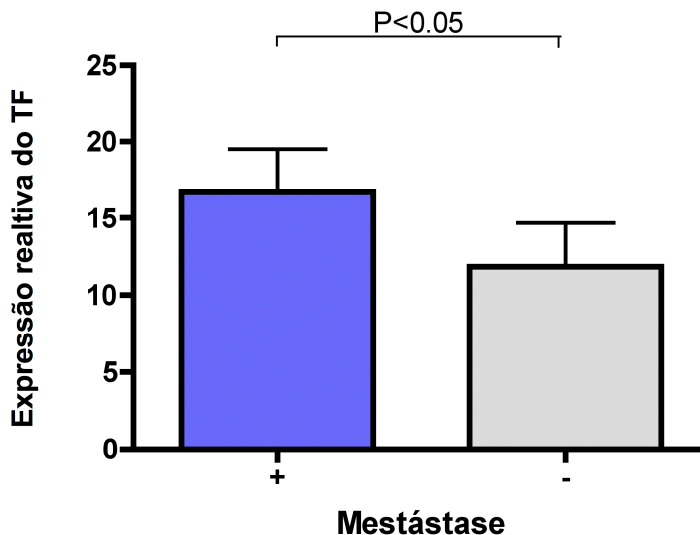
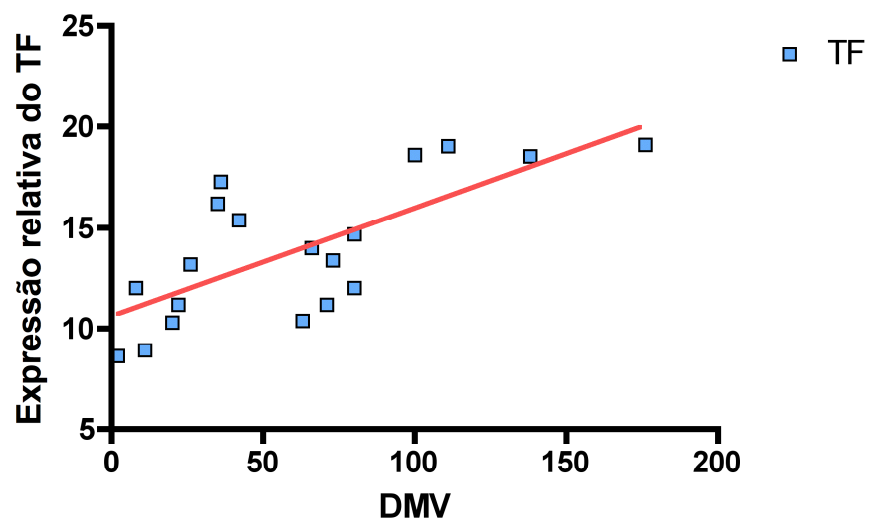


FIGURA 8. Expressão do FT em amostras obtidas de TW metastáticos (+) e não metastáticos (-). Médias e desvio padrão de lesões metastáticas (n=12) e não metastáticas (n=13). A expressão do FT foi mais elevada em tumores metastáticos ($P < 0.05$)

6.4 Densidade Microvascular (DMV) e Expressão do FT

Para associação entre a expressão do FT e DMV foi utilizado dados das amostras determinadas por Maciel *et al* (1). Somente os dados de 25 espécimens foram incluídos nessa análise, pois não se obteve informações de DMV para todas as amostras. Análise de correlação (Pearson) revelou associação positiva ($P < 0.05$) entre os níveis de TF e a DMV (Figura 9).



Pearson $r = 0.7211$
 $r^2 = 0.522$
 $P < 0.05$

FIGURA 9. Gráfico de regressão demonstrando a correlação entre a DMV e a expressão do FT. A associação apresentou-se positiva ($p < 0.05$).

7 DISCUSSÃO

Tumores pediátricos renais representam um grupo relativamente comum de tumores da infância, em que ambos, diagnóstico e tratamento são altamente dependentes da classificação histopatológica (12). O Tumor de Wilms (TW), ou Nefroblastoma, é a neoplasia do aparelho urinário mais comum na pediatria. Representa cerca de 8% dos tumores sólidos da infância, ocupando o quinto lugar em frequência. O TW afeta 1 em cada 10.000 crianças nascidas vivas (3-6), com igual frequência entre os sexos e com maior incidência entre 1 e 5 anos de idade, mais precisamente no terceiro ano de vida. Apesar da sua rara ocorrência no período neonatal, mais de 75% das crianças afetadas tem menos de quatro anos de idade e pelo menos 90% tem menos de sete anos ao diagnóstico (3, 5-7). O perfil epidemiológico dos pacientes, no presente estudo, com variação etária entre 0,3 e 7 e a média de 2,9 anos, sendo similar aos dados de outras análises (18, 48, 49, 51), como no estudo do GCBTTW que apresentou 3,8 anos de média (51). Entre os sexos, nossa casuística foi composta por 55,6% de pacientes do sexo feminino e 44,4% do sexo masculino, demonstrando-se diferente da maioria dos estudos, como o apresentado pelo NWTs que encontrou uma leve predominância do sexo masculino (59). Entretanto, nossos dados não diferem muito aos encontrados pelo GCBTTW que observam uma igualdade entre os sexos (51) e dos dados epidemiológicos do Canadá e Estados Unidos, que verificaram, também, uma maior incidência do sexo feminino (9.7 por milhão/habitante) do que no sexo masculino (8.4 por milhão/habitante) (8, 50).

Igualmente correspondendo à literatura, nossa amostra exhibe a localização do rim esquerdo como o mais acometido, com 59,3% dos casos, e 40,7% para o rim direito. Dados semelhantes ao encontrado por Suita et al (198), que examinando uma série de 90 encontrou 54,4% de acometimento no rim esquerdo, 35,6% no rim direito e 10% de bilateralidade, contudo nossa amostra não teve nenhum caso de bilateralidade.

Entre os fatores prognósticos comprovados, o estadiamento tumoral é um dos mais importantes. Foi verificado, baseado na classificação da SIOP-9, que a maior casuística, do presente estudo, foi do estágio II, com 40,7%, seguida pelos estágios III, com 25,9%, I, com 18,5% e IV, com 14,8% (Tabela 3). Essa grande frequência de estádios avançados nesses pacientes poderia ser explicada, em parte, ao atraso no diagnóstico. Estudo do NWTS4 mostrou que crianças maiores de 48 meses, apresentam-se já com doença avançada ao diagnóstico, assim aumentando sua probabilidade de recidiva da doença e morte, e atribuíram esta associação ao atraso no diagnóstico, mais frequentemente observado nessa faixa etária de crianças (47). O padrão histológico prevalente é a histologia favorável (HF) em aproximadamente 89% dos casos, sendo que a histologia desfavorável (HD) está presente em 11% dos casos, conforme a classificação do NWTS (54). Esses dados se equiparam ao encontrado nesse estudo, com 81,5% das amostras composta de histologia favorável.

O principal achado e objeto do estudo foi a associação significativa da expressão diferencial do Fator Tecidual (TF) do grupo tumor quando comparada com as espécimes do grupo controle, ou seja, áreas livres de tumor, essa expressão do FT se deu em média 14.38 e 16.02 vezes mais no componente tumoral, respectivamente, que no componente controle (não tumoral) ($P < 0.001$). Assim, como Azevedo et al (170), utilizando de mesma técnica (RT-PCR), observou em peças de biópsias de adenocarcinoma colorretal que a expressão do FT foi significativamente mais alta do que no grupo controle, apresentou ainda uma associação positiva, dessa expressão do FT, com a idade mais elevada dos pacientes e com a presença de metástases.

Esses dados sugerem que a expressão do FT está presente nos TW, demonstrando assim, a possibilidade de sua atuação na progressão desses tumores, permitindo ainda considerar como um via de sinalização celular, com a finalidade de diminuir seu efeito sobre a progressão do TW.

Vários autores concordam que o FT desempenha um papel fundamental na fisiopatologia do câncer devido a sua habilidade de estimular a produção de vasos sanguíneos e através dele criar uma proliferação vascular tumoral exagerada,

muitas vezes relacionado a um pior prognóstico oncológico em diversos tipos de lesões malignas, sendo esse um dos principais pontos envolvidos no estudo do papel desempenhado pelo fator tecidual na progressão do câncer.

Tumores malignos sólidos pediátricos tem melhores resultados de sobrevida comparados com os tumores malignos dos adultos (44). No entanto, o prognóstico continua sombrio para pacientes com metástase de tais tumores pediátricos, apesar das terapias agressivas (quimioterapia e radioterapia) associadas à cirurgia. Novas abordagens terapêuticas são imprescindíveis para um melhor prognóstico nessa população pediátrica (45).

No total de 27 amostras da pesquisa, 21 delas foram quantificadas em blastomas, 13 em componentes epiteliais, 5 estromais. Os resultados revelaram que o componente blastematoso e epitelial apresentaram maior expressão do FT relativamente ao componente estromal e controle. Evidenciando-se que em componentes do tipo blastoma e epitelial o FT é expresso, respectivamente, 14.38 e 16.02 vezes mais que no componente controle não tumoral ($P < 0.001$). O componente estromal apresentou expressão muito semelhante àquela do controle, apenas 3.8 vezes mais, não atingindo significância nessa análise ($P > 0.05$). Assim, apresentando conformidade aos dados da Maciel et al (1), que demonstraram a expressão do FT, através de análise imonistoquímica, na membrana celular e citoplasma dessas mesmas células analisadas de TW, onde essa expressão do antígeno ocorreu notavelmente na região do blastema e do epitélio desses tumores, mas não se expressou ou exprimiu fracamente no tecido estromal. Esses achados refletem outras pesquisas com expressão do FT em diferentes tumores malignos, onde sua expressão se encontrou aumentada nos tumores malignos como no pulmonar, de pequenas células (164); nos gliomas (165); nos carcinomas de mama (166); pâncreas (167); cólon (168, 170) e próstata (169), sendo também relacionada com estágios avançados dessas doenças, nos quais a alta expressão do FT também foi fator prognóstico desfavorável (127, 132).

Embora, constando de um pequeno número de pacientes analisados, observou-se uma associação entre o aumento da expressão do FT e presença de metástase. A média de expressão do FT nas peças diagnosticadas como

metastáticas foi significativamente maior (16.3 vezes) que em espécimes não disseminados (11.2 vezes), sendo a diferença significativa ($P < 0.05$), mais uma vez ratificando os dados de Maciel et al (1), que tinham demonstrado correlação da expressão do FT com recidiva tumoral (132, 146, 151, 174-176, 183, 185, 186).

Os resultados do presente estudo revelaram associação positiva entre os níveis de TF e a DMV, corroborando com outros estudos (169, 184), assim como Poon et al (184) que observou, estudando casos de carcinoma hepatocelular, a correlação positiva entre a expressão do FT e a DMV. Abdulkhadir et al (169), em estudos de câncer de próstata, também encontraram essa associação entre o aumento da DMV e casos positivos para FT, levando-os a concluir que a sua expressão poderá servir como um marcador da agressividade dos tumores prostáticos, assim como, um indicador de angiogênese aumentada. Koomagi et al (187) associaram a atividade do FT à intensidade da expressão de VEGF e com a DMV em neoplasias malignas pulmonares do tipo não pequenas células. Fillmann et al (188) observou em adenocarcinoma do cólon e reto a associação significativa do aumento da DMV em lesões nas quais a expressão do FT é elevada.

Divergindo dos achados de Maciel et al (1) e Maahs et al (189) não encontraram correlação positiva entre o aumento da expressão do FT e uma maior DMV. Isso levou ao questionamento se e quanto poderia expressar o FT nos tecidos metastáticos, pois a análise se restringiu ao estudo do TW primário, se existiria a possibilidade de associação entre uma maior expressão do FT, em um dos tipos de componentes histológicos, induzir uma maior habilidade de disseminação tumoral, assim, apresentando-se como indutor e marcador de metastástase.

Ao utilizar as ferramentas de análises moleculares, na observação da expressão do FT, inseriu-se a pesquisa importantes dados necessários para uma melhor compreensão das vias de tumorigêneses dependentes dos processos de coagulação (73, 121, 141, 148, 150, 152, 153, 172) e angiogênese (75, 150).

Maciel et al (1) foram pioneiros na análise da associação do FT em TW, utilizando a técnica de imunistoquímica, assim expandindo as possibilidades de análise de outras vias de sinalização celular e intervenção terapêuticas.

Entretanto, dados referentes à importância do FT em células tumorais devem ser interpretados com cautela, uma vez que a expressão funcional e antigênica é fortemente dependente da origem de tecido maligno e pode mudar quando as células são manipuladas *in vitro* (191).

Em face de esses achados, o estudo das interações entre o FT e o câncer, especialmente no que se refere aos seus mecanismos de ação, pode abrir um campo alternativo de tratamento com possibilidade de novas abordagens terapêuticas das neoplasias malignas (131, 157, 160), envolvendo não só o controle da expressão de substâncias pró-angiogênicas, mas também dos sistemas regulatórios da coagulação sanguínea e microambiente tumoral.

8 CONCLUSÃO

1. A expressão diferencial do FT se encontra aumentada no TW e a maior variação do FT foi observada nos componentes blastematoso e epitelial, enquanto no componente estromal apresentou variação mínima em relação ao tecido não tumoral.
2. O aumento da DMV apresentou associação positiva com a expressão do FT. Entretanto, a sinalização celular desse processo e seu efeito sobre eventos angiogênicos no TW deveriam ser investigados melhor.
3. Em lesões metastáticas o FT se mostrou significativamente mais elevado, sugerindo um papel importante para essa proteína no processo de disseminação dessas células malignas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Maciel EO, Carvalhal GF, da Silva VD, Batista EL, Jr., Garicochea B. Increased tissue factor expression and poor nephroblastoma prognosis. *J Urol*. 2009 Oct;182(4):1594-9.
2. Schuz J, Kaletsch U, Meinert R, Kaatsch P, Michaelis J. High-birth weight and other risk factors for Wilms tumour: results of a population-based case-control study. *Eur J Pediatr*. 2001 Jun;160(6):333-8.
3. Coppes MJ, Haber DA, Grundy PE. Genetic events in the development of Wilms' tumor. *N Engl J Med*. 1994 Sep 1;331(9):586-90.
4. Pritchard-Jones K, Hawkins MM. Biology of Wilms' tumour. *Lancet*. 1997 Mar 8;349(9053):663-4.
5. Kaplinsky C, Ghahremani M, Frishberg Y, Rechavi G, Pelletier J. Familial Wilms' tumor associated with a WT1 zinc finger mutation. *Genomics*. 1996 Dec 15;38(3):451-3.
6. Koo HP, Hensle TW. Molecular biology of Wilms' tumor. *Urol Clin North Am*. 1993 May;20(2):323-31.
7. Pavilack MA, Walton DS. Genetics of aniridia: the Aniridia-Wilms' Tumor Association. *Int Ophthalmol Clin*. 1993 Spring;33(2):77-85.
8. Chu A, Heck JE, Ribeiro KB, Brennan P, Boffetta P, Buffler P, et al. Wilms' tumour: a systematic review of risk factors and meta-analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2010 Sep;24(5):449-69.
9. D'Angio GJ. The National Wilms Tumor Study: a 40 year perspective. *Lifetime Data Anal*. 2007 Dec;13(4):463-70.
10. Grovas A, Fremgen A, Rauck A, Ruymann FB, Hutchinson CL, Winchester DP, et al. The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. *Cancer*. 1997 Dec 15;80(12):2321-32.
11. Sonn G, Shortliffe LM. Management of Wilms tumor: current standard of care. *Nat Clin Pract Urol*. 2008 Oct;5(10):551-60.
12. Sebire NJ, Vujanic GM. Paediatric renal tumours: recent developments, new entities and pathological features. *Histopathology*. 2009 Apr;54(5):516-28.
13. Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer*. 2005 Sep;5(9):699-712.
14. Wagner KJ, Roberts SG. Transcriptional regulation by the Wilms' tumour suppressor protein WT1. *Biochem Soc Trans*. 2004 Dec;32(Pt 6):932-5.
15. Breslow NE, Takashima JR, Whitton JA, Moksness J, D'Angio GJ, Green DM. Second malignant neoplasms following treatment for Wilm's tumor: a report from the National Wilms' Tumor Study Group. *J Clin Oncol*. 1995 Aug;13(8):1851-9.
16. Green DM, Whitton JA, Stovall M, Mertens AC, Donaldson SS, Ruymann FB, et al. Pregnancy outcome of female survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 Oct;187(4):1070-80.

17. Fukuzawa R, Anaka MR, Heathcott RW, McNoe LA, Morison IM, Perlman EJ, et al. Wilms tumour histology is determined by distinct types of precursor lesions and not epigenetic changes. *J Pathol.* 2008 Aug;215(4):377-87.
18. Breslow NE, Beckwith JB, Perlman EJ, Reeve AE. Age distributions, birth weights, nephrogenic rests, and heterogeneity in the pathogenesis of Wilms tumor. *Pediatr Blood Cancer.* 2006 Sep;47(3):260-7.
19. Daniels JL, Pan IJ, Olshan AF, Breslow NE, Bunin GR, Ross JA. Obstetric history and birth characteristics and Wilms tumor: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Causes Control.* 2008 Dec;19(10):1103-10.
20. Cui H, Hedborg F, He L, Nordenskjold A, Sandstedt B, Pfeifer-Ohlsson S, et al. Inactivation of H19, an imprinted and putative tumor repressor gene, is a preneoplastic event during Wilms' tumorigenesis. *Cancer Res.* 1997 Oct 15;57(20):4469-73.
21. Leisenring WM, Breslow NE, Evans IE, Beckwith JB, Coppes MJ, Grundy P. Increased birth weights of National Wilms' Tumor Study patients suggest a growth factor excess. *Cancer Res.* 1994 Sep 1;54(17):4680-3.
22. Pritchard-Jones K. Molecular genetic pathways to Wilms tumor. *Crit Rev Oncog.* 1997;8(1):1-27.
23. Huff V, Amos CI, Douglass EC, Fisher R, Geiser CF, Krill CE, et al. Evidence for genetic heterogeneity in familial Wilms' tumor. *Cancer Res.* 1997 May 15;57(10):1859-62.
24. Royer-Pokora B, Beier M, Henzler M, Alam R, Schumacher V, Weirich A, et al. Twenty-four new cases of WT1 germline mutations and review of the literature: genotype/phenotype correlations for Wilms tumor development. *Am J Med Genet A.* 2004 Jun 15;127A(3):249-57.
25. Perlman EJ GJ, Togashi K Boccon-Gibod L. . Nephroblastoma. Pathology and genetics of tumors of the urinary system and male genital organs. IARC Press ed. Lyon: World Health Organization Classification of Tumors Series; 2004.
26. Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature.* 1993 Apr 22;362(6422):747-9.
27. Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, et al. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature.* 1993 Apr 22;362(6422):749-51.
28. Beckwith JB. Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. *Am J Med Genet.* 1998 Oct 2;79(4):268-73.
29. Schuz J, Schmidt LS, Kogner P, Lahteenmaki PM, Pal N, Stokland T, et al. Birth characteristics and Wilms tumors in children in the Nordic countries: A register-based case-control study. *Int J Cancer.* 2010 Jul 6.
30. Schumacher V, Schuhen S, Sonner S, Weirich A, Leuschner I, Harms D, et al. Two molecular subgroups of Wilms' tumors with or without WT1 mutations. *Clin Cancer Res.* 2003 Jun;9(6):2005-14.
31. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature.* 1990 Feb 22;343(6260):774-8.
32. Ogawa O, Eccles MR, Yun K, Mueller RF, Holdaway MD, Reeve AE. A novel insertional mutation at the third zinc finger coding region of the WT1 gene in Denys-Drash syndrome. *Hum Mol Genet.* 1993 Feb;2(2):203-4.
33. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 1993 Aug 27;74(4):679-91.

34. Hastie ND. The genetics of Wilms' tumor--a case of disrupted development. *Annu Rev Genet.* 1994;28:523-58.
35. Dressler GR, Douglass EC. Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Feb 15;89(4):1179-83.
36. Lechner MS, Dressler GR. The molecular basis of embryonic kidney development. *Mech Dev.* 1997 Mar;62(2):105-20.
37. Suminoe A, Matsuzaki A, Kinukawa N, Inamitsu T, Tajiri T, Suita S, et al. Rapid somatic growth after birth in children with neuroblastoma: A survey of 1718 patients with childhood cancer in Kyushu-Okinawa district. *J Pediatr.* 1999 Feb;134(2):178-84.
38. Fukuzawa R, Reeve AE. Molecular pathology and epidemiology of nephrogenic rests and Wilms tumors. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007 Sep;29(9):589-94.
39. Ravenel JD, Broman KW, Perlman EJ, Niemitz EL, Jayawardena TM, Bell DW, et al. Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Nov 21;93(22):1698-703.
40. McLaughlin J, Lipworth, L, Tarone, RE, Blot, WJ. *Cancer Epidemiology and Prevention New York: Oxford University Press; 2006.*
41. Infante-Rivard C, Weichenthal S. Pesticides and childhood cancer: an update of Zahm and Ward's 1998 review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2007 Jan-Mar;10(1-2):81-99.
42. Zahm SH, Ward MH. Pesticides and childhood cancer. *Environ Health Perspect.* 1998 Jun;106 Suppl 3:893-908.
43. Blaltj Lee PAaTSR. *Diagnosis and evaluation of the child with câncer. New York; 1998.*
44. McGregor LM, Metzger ML, Sanders R, Santana VM. Pediatric cancers in the new millennium: dramatic progress, new challenges. *Oncology (Williston Park).* 2007 Jun;21(7):809-20; discussion 20, 23-4.
45. Vassal G. Has chemotherapy reached its limits in pediatric cancers? *Eur J Cancer.* 2005 Mar;41(4):564-75; discussion 76-7.
46. Plesko I, Kramarova E, Stiller CA, Coebergh JW, Santaquilani M. Survival of children with Wilms' tumour in Europe. *Eur J Cancer.* 2001 Apr;37(6):736-43.
47. Graboisa M, Mendonça, GAS. Prognóstico de pacientes com tumor de Wilms unilateral no Rio de Janeiro, 1990-2000 *Revista de Saúde Pública da USP . 2005;5(39):731-5.*
48. Breslow N, Beckwith JB, Ciol M, Sharples K. Age distribution of Wilms' tumor: report from the National Wilms' Tumor Study. *Cancer Res.* 1988 Mar 15;48(6):1653-7.
49. Pastore G, Carli M, Lemerle J, Tournade MF, Voute PA, Rey A, et al. Epidemiological features of Wilms' tumor: results of studies by the International Society of Paediatric Oncology (SIOP). *Med Pediatr Oncol.* 1988;16(1):7-11.
50. Wu X, McLaughlin, CC, Lake, A, Firth, R, et al. *Cancer in North American: North American Association of Central Cancer Registries.; 2007.*
51. Franco EL, de Camargo B, Saba L, Marques LA. Epidemiological and clinical correlations with genetic characteristics of Wilms' tumor: results of the Brazilian Wilms' Tumor Study Group. *Int J Cancer.* 1991 Jul 9;48(5):641-6.
52. de Camargo B. Formação de um grupo cooperativo brasileiro para o tratamento do tumor de Wilms. *J Bras Urol.* 1987;13(2):52-6.

53. Delemarre JF, Sandstedt B, Harms D, Boccon-Gibod L, Vujanic GM. The new SIOP (Stockholm) working classification of renal tumours of childhood. *International Society of Paediatric Oncology. Med Pediatr Oncol.* 1996 Feb;26(2):145-6.
54. Beckwith JB. National Wilms Tumor Study: an update for pathologists. *Pediatr Dev Pathol.* 1998 Jan-Feb;1(1):79-84.
55. Faria P BJ, Mishra K, Zuppan C, Weeks DA, Breslow N et al. Focal versus diffuse anaplasia in Wilms tumor – new definitions with prognostic significance: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *Am J Surg Pathol* 1996;20:909-20.
56. Neville HL, Ritchey ML. Wilms' tumor. Overview of National Wilms' Tumor Study Group results. *Urol Clin North Am.* 2000 Aug;27(3):435-42.
57. Pritchard J, Imeson J, Barnes J, Cotterill S, Gough D, Marsden HB, et al. Results of the United Kingdom Children's Cancer Study Group first Wilms' Tumor Study. *J Clin Oncol.* 1995 Jan;13(1):124-33.
58. de Camargo B, Franco EL. A randomized clinical trial of single-dose versus fractionated-dose dactinomycin in the treatment of Wilms' tumor. Results after extended follow-up. Brazilian Wilms' Tumor Study Group. *Cancer.* 1994 Jun 15;73(12):3081-6.
59. Tournade MF, Com-Nougue C, de Kraker J, Ludwig R, Rey A, Burgers JM, et al. Optimal duration of preoperative therapy in unilateral and nonmetastatic Wilms' tumor in children older than 6 months: results of the Ninth International Society of Pediatric Oncology Wilms' Tumor Trial and Study. *J Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):488-500.
60. Graf N, Tournade MF, de Kraker J. The role of preoperative chemotherapy in the management of Wilms' tumor. The SIOP studies. *International Society of Pediatric Oncology. Urol Clin North Am.* 2000 Aug;27(3):443-54.
61. Green DM. The treatment of stages I-IV favorable histology Wilms' tumor. *J Clin Oncol.* 2004 Apr 15;22(8):1366-72.
62. Zhang Q, Shan Y, Wang JX, Dong R, Yang SB, Zheng S. Detection of biomarkers in children with Wilms' tumor using proteinchip technology. *Chin Med J (Engl).* Jul;123(14):1939-41.
63. D'Angio G. Pediatric oncology refracted through the prism of Wilms tumor: a discourse. *J Urol.* 2000 Dec;164(6):2073-7.
64. D'Angio GJ, Vietti TJ. Old man river. The flow of pediatric oncology. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2001 Aug;15(4):599-607, vii.
65. Beckwith JB. Revised SIOP working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol.* 2002 Feb;38(2):77-8.
66. Spreafico F, Bellani FF. Wilms' tumor: past, present and (possibly) future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006 Feb;6(2):249-58.
67. Perlman EJ. Pediatric renal tumors: practical updates for the pathologist. *Pediatr Dev Pathol.* 2005 May-Jun;8(3):320-38.
68. de Camargo B. *Tumor de Wilms.* Rio de Janeiro: Revinter; 1998.
69. Vujanic GM, Harms D, Sandstedt B, Weirich A, de Kraker J, Delemarre JF. New definitions of focal and diffuse anaplasia in Wilms tumor: the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) experience. *Med Pediatr Oncol.* 1999 May;32(5):317-23.
70. Metzger ML, Dome JS. Current therapy for Wilms' tumor. *Oncologist.* 2005 Nov-Dec;10(10):815-26.

71. Ghanem MA, Van der Kwast TH, Den Hollander JC, Sudaryo MK, Oomen MH, Noordzij MA, et al. Expression and prognostic value of Wilms' tumor 1 and early growth response 1 proteins in nephroblastoma. *Clin Cancer Res*. 2000 Nov;6(11):4265-71.
72. Green DM, D'Angio GJ, Beckwith JB, Breslow NE, Grundy PE, Ritchey ML, et al. Wilms tumor. *CA Cancer J Clin*. 1996 Jan-Feb;46(1):46-63.
73. Garnier D, Milsom C, Magnus N, Meehan B, Weitz J, Yu J, et al. Role of the tissue factor pathway in the biology of tumor initiating cells. *Thromb Res*. 2010 Apr;125 Suppl 2:S44-50.
74. Reynes G, Vila V, Martin M, Parada A, Fleitas T, Reganon E, et al. Circulating markers of angiogenesis, inflammation, and coagulation in patients with glioblastoma. *J Neurooncol*. Jul 6.
75. Rak J, Milsom C, Yu J. Tissue factor in cancer. *Curr Opin Hematol*. 2008 Sep;15(5):522-8.
76. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
77. Nyberg P, Salo T, Kalluri R. Tumor microenvironment and angiogenesis. *Front Biosci*. 2008;13:6537-53.
78. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 2001 Feb;23(2):147-59.
79. Dickinson AJ, Fox SB, Persad RA, Hollyer J, Sibley GN, Harris AL. Quantification of angiogenesis as an independent predictor of prognosis in invasive bladder carcinomas. *Br J Urol*. 1994 Dec;74(6):762-6.
80. Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*. 1995 Dec 28;333(26):1757-63.
81. Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res*. 1994 Feb 1;54(3):800-4.
82. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 Jan 3;324(1):1-8.
83. Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med*. 2001 Feb;7(2):192-8.
84. Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res*. 2005 Oct 15;65(20):9155-8.
85. Van den Eynden GG, Van Laere SJ, Van der Auwera I, Gilles L, Burn JL, Colpaert C, et al. Differential expression of hypoxia and (lymph)angiogenesis-related genes at different metastatic sites in breast cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2007;24(1):13-23.
86. Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS, et al. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 16;100(19):10623-8.
87. Lacorre DA, Baekkevold ES, Garrido I, Brandtzaeg P, Haraldsen G, Amalric F, et al. Plasticity of endothelial cells: rapid dedifferentiation of freshly isolated high endothelial venule endothelial cells outside the lymphoid tissue microenvironment. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4164-72.
88. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Apr;6(4):273-86.

89. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 2001 Dec 27;345(26):1890-900.
90. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol*. 2002 Dec;29(6 Suppl 16):15-8.
91. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.
92. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):653-60.
93. Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med*. 1996 Feb;2(2):167-8.
94. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 2004 Dec;56(4):549-80.
95. Bian XW, Chen JH, Jiang XF, Bai JS, Wang QL, Zhang X. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer. *Int Immunopharmacol*. 2004 Nov;4(12):1537-47.
96. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
97. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res*. 2005 May 15;65(10):3967-79.
98. Ribatti D. Genetic and epigenetic mechanisms in the early development of the vascular system. *J Anat*. 2006 Feb;208(2):139-52.
99. McDonald DM, Foss AJ. Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent. *Cancer Metastasis Rev*. 2000;19(1-2):109-20.
100. Forster-Horvath C, Meszaros L, Raso E, Dome B, Ladanyi A, Morini M, et al. Expression of CD44v3 protein in human endothelial cells in vitro and in tumoral microvessels in vivo. *Microvasc Res*. 2004 Sep;68(2):110-8.
101. Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, et al. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest*. 2006 Oct;116(10):2610-21.
102. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):505-15.
103. 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 Mar 23;223(4642):1296-9.
104. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*. 1995 May;146(5):1029-39.
105. Saclarides TJ. Angiogenesis in colorectal cancer. *Surg Clin North Am*. 1997 Feb;77(1):253-60.
106. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer*. 1996 Dec;32A(14):2451-60.
107. Scavelli C, Vacca A, Di Pietro G, Dammacco F, Ribatti D. Crosstalk between angiogenesis and lymphangiogenesis in tumor progression. *Leukemia*. 2004 Jun;18(6):1054-8.
108. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jun;8(6):464-78.
109. 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 Nov-Dec;13(6):856-62.

110. 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 Jun;89(6):2890-6.
111. Brieger J, Bedavanija A, Lehr HA, Maurer J, Mann WJ. Expression of angiogenic growth factors in acoustic neurinoma. *Acta Otolaryngol.* 2003 Dec;123(9):1040-5.
112. 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 Jul 20;115(6):975-80.
113. 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 Jan-Feb;14(1):82-8.
114. Du JR, Jiang Y, Zhang YM, Fu H. Vascular endothelial growth factor and microvascular density in esophageal and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol.* 2003 Jul;9(7):1604-6.
115. 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 Mar;129(3):302-8.
116. Chung YS, Maeda K, Sowa M. Prognostic value of angiogenesis in gastro-intestinal tumours. *Eur J Cancer.* 1996 Dec;32A(14):2501-5.
117. 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 Dec;45(6):612-8.
118. Tsujitani S, Saito H, Maeta Y, Yamaguchi K, Tatebe S, Kondo A, et al. Neoangiogenesis in patients with gastric carcinoma in relation to the expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. *Anticancer Res.* 2004 May-Jun;24(3b):1853-9.
119. 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 Mar;12(1):31-5.
120. Yao DF, Wu XH, Zhu Y, Shi GS, Dong ZZ, Yao DB, et al. Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor, microvascular density and their clinicopathologic features in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005 May;4(2):220-6.
121. Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest.* 2003 Sep;124(3 Suppl):58S-68S.
122. Ollivier V, Chabbat J, Herbert JM, Hakim J, de Prost D. Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 May;20(5):1374-81.
123. Fernandez PM, Patierno SR, Rickles FR. Tissue factor and fibrin in tumor angiogenesis. *Semin Thromb Hemost.* 2004 Feb;30(1):31-44.
124. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2006 Jan;3(1):24-40.
125. Bender JL AP, Reid JM, et al. . Phase I trial and pharmacokinetic study of bevacizumab in pediatric patients with refractory solid tumors : a Children's Oncology Group Study. . *J Clin Oncol* 2008;26:399-405.

126. Rossler J, Geogerger B, Taylor M, Vassal G. Small molecule tyrosine kinase inhibitors: potential role in pediatric malignant solid tumors. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008 Feb;8(1):76-85.
127. Taylor M, Rossler J, Geogerger B, Laplanche A, Hartmann O, Vassal G, et al. High levels of circulating VEGFR2+ Bone marrow-derived progenitor cells correlate with metastatic disease in patients with pediatric solid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 15;15(14):4561-71.
128. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(8):2839-43.
129. Franco RF. FISILOGIA DA COAGULAÇÃO, ANTICOAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE. Simpósio: HEMOSTASIA E TROMBOSE; 2001 jul./dez. 2001; Ribeirão Preto; 2001. p. 229-37.
130. Carmeliet P, Collen D. Tissue factor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998 Jun;30(6):661-7.
131. Yu JL, Xing R, Milsom C, Rak J. Modulation of the oncogene-dependent tissue factor expression by kinase suppressor of ras 1. *Thromb Res*. 2010 Jul;126(1):e6-10.
132. Mackman N. The many faces of tissue factor. *J Thromb Haemost*. 2009 Jul;7 Suppl 1:136-9.
133. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J Thromb Thrombolysis*. 2003 Aug-Oct;16(1-2):17-20.
134. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev*. 2003 Sep;17 Suppl 1:S1-5.
135. Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*. 2008 Feb 21;451(7181):914-8.
136. Ruf W, Yokota N, Schaffner F. Tissue factor in cancer progression and angiogenesis. *Thromb Res*. 2010 Apr;125 Suppl 2:S36-8.
137. Rendrik F. FISILOGIA DA COAGULAÇÃO, ANTICOAGULAÇÃO E FIBRINÓLISE. Simpósio: HEMOSTASIA E TROMBOSE; 2001 jul./dez. 2001; Ribeirão Preto; 2001. p. 229-37.
138. Buller HR, van Doormaal FF, van Sluis GL, Kamphuisen PW. Cancer and thrombosis: from molecular mechanisms to clinical presentations. *J Thromb Haemost*. 2007 Jul;5 Suppl 1:246-54.
139. Amirkhosravi A, Meyer T, Warnes G, Amaya M, Malik Z, Biggerstaff JP, et al. Pentoxifylline inhibits hypoxia-induced upregulation of tumor cell tissue factor and vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost*. 1998 Oct;80(4):598-602.
140. Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vilorio-Petit A, Filmus J, et al. Oncogenes and tumor angiogenesis: differential modes of vascular endothelial growth factor up-regulation in ras-transformed epithelial cells and fibroblasts. *Cancer Res*. 2000 Jan 15;60(2):490-8.
141. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1734-41.
142. Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer Res*. 2005 Feb 15;65(4):1406-13.

143. Milsom C, Rak J. Regulation of tissue factor and angiogenesis-related genes by changes in cell shape. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Dec 2;337(4):1267-75.
144. Milsom CC, Yu JL, Mackman N, Micallef J, Anderson GM, Guha A, et al. Tissue factor regulation by epidermal growth factor receptor and epithelial-to-mesenchymal transitions: effect on tumor initiation and angiogenesis. *Cancer Res*. 2008 Dec 15;68(24):10068-76.
145. 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 Feb;30(1):21-30.
146. Rong Y, Belozarov VE, Tucker-Burden C, Chen G, Durden DL, Olson JJ, et al. Epidermal growth factor receptor and PTEN modulate tissue factor expression in glioblastoma through JunD/activator protein-1 transcriptional activity. *Cancer Res*. 2009 Mar 15;69(6):2540-9.
147. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med*. 1996 Feb;2(2):209-15.
148. Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation*. 1997 Feb 4;95(3):594-9.
149. Jang Y, Guzman LA, Lincoff AM, Gottsauner-Wolf M, Forudi F, Hart CE, et al. Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation*. 1995 Nov 15;92(10):3041-50.
150. Rickles FR. Mechanisms of cancer-induced thrombosis in cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2006;35(1-2):103-10.
151. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):133-41.
152. Tesselaar ME, Romijn FP, Van Der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S. Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost*. 2007 Mar;5(3):520-7.
153. Aharon A, Brenner B. Microparticles, thrombosis and cancer. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2009 Mar;22(1):61-9.
154. Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*. 1996 Sep 5;383(6595):73-5.
155. Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A, Vlasuk GP, Rote WE, Green SJ, et al. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res*. 2003 Jun 1;63(11):2997-3000.
156. Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Ellies LG, Andrade-Gordon P, Mueller BM, et al. Protease-activated receptor (PAR) 2, but not PAR1, signaling promotes the development of mammary adenocarcinoma in polyoma middle T mice. *Cancer Res*. 2008 Sep 1;68(17):7219-27.
157. Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *Thromb Haemost*. 1997 Jul;78(1):747-54.
158. Armesilla AL, Lorenzo E, Gomez del Arco P, Martinez-Martinez S, Alfranca A, Redondo JM. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor of activated T

- cells in human endothelial cells: a role for tissue factor gene expression. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):2032-43.
159. Mechtcheriakova D, Schabbauer G, Lucerna M, Clauss M, De Martin R, Binder BR, et al. Specificity, diversity, and convergence in VEGF and TNF-alpha signaling events leading to tissue factor up-regulation via EGR-1 in endothelial cells. *Faseb J.* 2001 Jan;15(1):230-42.
160. Lozano J, Xing R, Cai Z, Jensen HL, Tremplus C, Mark W, et al. Deficiency of kinase suppressor of Ras1 prevents oncogenic ras signaling in mice. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):4232-8.
161. Rickles FR, Levine MN. Epidemiology of thrombosis in cancer. *Acta Haematol.* 2001;106(1-2):6-12.
162. Prandoni P, Lensing AW, Buller HR, Cogo A, Prins MH, Cattelan AM, et al. Deep-vein thrombosis and the incidence of subsequent symptomatic cancer. *N Engl J Med.* 1992 Oct 15;327(16):1128-33.
163. Goad KE, Gralnick HR. Coagulation disorders in cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1996 Apr;10(2):457-84.
164. Sawada M, Miyake S, Ohdama S, Matsubara O, Masuda S, Yakumaru K, et al. Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. *Br J Cancer.* 1999 Feb;79(3-4):472-7.
165. Guan M, Jin J, Su B, Liu WW, Lu Y. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clin Biochem.* 2002 Jun;35(4):321-5.
166. Ueno T, Toi M, Koike M, Nakamura S, Tominaga T. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer.* 2000 Jul;83(2):164-70.
167. Ueda C, Hirohata Y, Kihara Y, Nakamura H, Abe S, Akahane K, et al. Pancreatic cancer complicated by disseminated intravascular coagulation associated with production of tissue factor. *J Gastroenterol.* 2001 Dec;36(12):848-50.
168. Lykke J, Nielsen HJ. The role of tissue factor in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2003 Jun;29(5):417-22.
169. Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z, Kisiel W, Humphrey PA, Catalona WJ, et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol.* 2000 Apr;31(4):443-7.
170. Azevedo NA. Expressão diferencial do fator tecidual (TF) no Adenocarcinoma colorretal por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT – PC).
. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-PUCRS; 2010.
171. 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 Jul;4(7):769-72.
172. 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 Feb;73(2):145-50.
173. Abe K, Shoji M, Chen J, Bierhaus A, Danave I, Micko C, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jul 20;96(15):8663-8.

174. Mueller BM, Ruf W. Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest.* 1998 Apr 1;101(7):1372-8.
175. Seto S, Onodera H, Kaido T, Yoshikawa A, Ishigami S, Arii S, et al. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer.* 2000 Jan 15;88(2):295-301.
176. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C, Miki C, Gabazza EC, Nobori T, et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol.* 2002 Apr;69(4):247-54.
177. Kleinman NR LK, Culp LA., . Tumor progression of human neuroblastoma cells tagged with a lacZ marker gene; earliest est events at ectopic injection sites. . *Br J Cancer* 1994;69:670-9.
178. Ribatti D, Vacca A, Nico B, De Falco G, Giuseppe Montaldo P, Ponzoni M. Angiogenesis and anti-angiogenesis in neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 2002 Apr;38(6):750-7.
179. Langer J VP, Perret J, Fontaine J, Atassi G, Robberecht P. . Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in human neuroblastoma. . *Med Pediatr Oncol* . 2000;34(49):386-93.
180. Motawa E, et al. . Clinical significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in será of patients with pediatric malignancies. . *Journal of the Egyptian Nat Cncer.* 2004;16(1).
181. Egyert AJ, N and Kiatkowska, J. High level of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblasomas. *Clin Cncer Res.* 2000;5:1900-80.
182. 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 May 1;77(9):1877-83.
183. Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y, Yamada T, Honda K, Yanagihara K, et al. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Apr 1;11(7):2531-9.
184. 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 Nov 1;9(14):5339-45.
185. 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. *Hepatogastroenterology.* 2005 Sep-Oct;52(65):1383-7.
186. Akashi T, Furuya Y, Ohta S, Fuse H. Tissue factor expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Urology.* 2003 Dec;62(6):1078-82.
187. 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 Feb 20;79(1):19-22.
188. Fillmann L. A Expressão do Fator Tecidual no adenocarcinoma colo-retal: relao com angiogênese e aspectos clínicos-patológicos. Porto Alegre: PUCRS; 2006.
189. Maahs G. Fator tecidual e densidade microvascular com fatores preditivos de metástases ganglionares no carcinoma epidermóide de boca. Porto Alegre: PUCRS; 2008.

190. Rak J, Milsom C, May L, Klement P, Yu J. Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. *Semin Thromb Hemost.* 2006 Feb;32(1):54-70.
191. Caine GJ, Stonelake PS, Lip GY, Kehoe ST. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia.* 2002 Nov-Dec;4(6):465-73.
192. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000 Oct;25(2):169-93.
193. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005 Jul;39(1):75-85.
194. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Jun 16;259(3):523-6.
195. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
196. Olsvik PA, Lie KK, Jordal AE, Nilsen TO, Hordvik I. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol Biol.* 2005;6:21.
197. Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 15;31(14):e73.
198. Suita A, Kinoshita, Y, Tajiri, T, Hara, T, Tsuneyoshi, M, et al. Clinical characteristics and outcome of Wilms tumors with a favorable histology in Japan: a report from the Study Group for pediatric Solid Malignant Tumor. *J Ped Surg.* 2006;41(9):1501-5.

ANEXO A



OF.CEP-944/10

Porto Alegre, 03 de setembro de 2010.

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 10/05168 intitulado "**Expressão do fator tecidual no tumor de wilms por reação da cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)**".

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e finais deverão ser encaminhados a este CEP..

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof. Vinicius Duval da Silva
FO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000

Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345

E-mail: cep@pucrs.br

www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO B

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

Título do Projeto:

"EXPRESSÃO DO FATOR TECIDUAL (FT) NO TUMOR DE WILMS POR REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)."

Cadastro no Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS Ofícios: 944/10 e 10/05168-CEP.

Os autores do presente projeto de pesquisa se comprometem a manter o sigilo dos dados de identificação coletados em prontuários e bases de dados referentes a pacientes atendidos no Hospital São Lucas da PUCRS

As informações serão utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica, preservando-se integralmente o anonimato dos pacientes.

Porto Alegre, 2010

Autores do Projeto:

Prof.Dr.Vinicius Duval da Silva _____

Prof.Dr.Eraldo Luiz Batista Júnior _____

Carla Costa Moreira _____